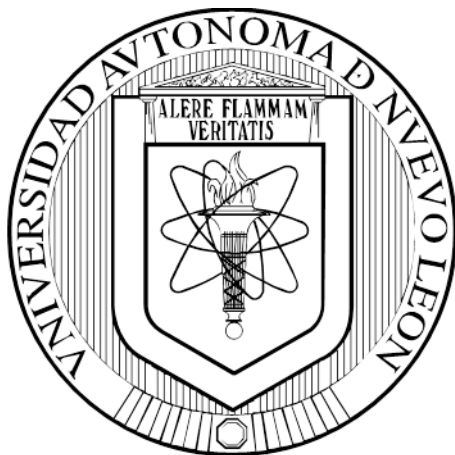


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE MEDICINA**



**OBTENCIÓN DE COMPUESTO(S) CON ACTIVIDAD INHIBITORIA DE  $\alpha$ -  
GLUCOSIDASA A PARTIR DE *Schinus molle*.**

**POR**

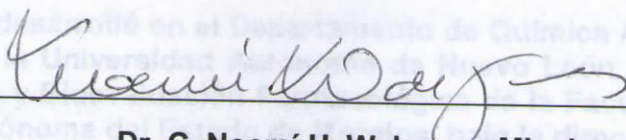
**Q.C.B. GUALBERTO MORA CASTILLO**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN  
QUÍMICA BIOMÉDICA**

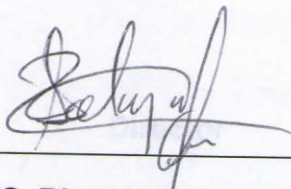
**SEPTIEMBRE, 2017**

**OBTENCIÓN DE COMPUESTO(S) CON ACTIVIDAD INHIBITORIA DE  $\alpha$ -  
GLUCOSIDASA A PARTIR DE *Schinus molle*.**

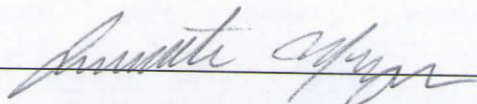
**Aprobación de la tesis:**



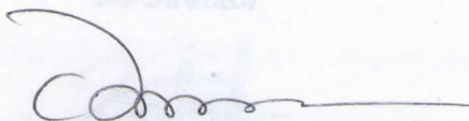
**Dr. C. Noemí H. Waksman Minsky**  
**Director de Tesis**



**Dr. C. Ricardo Salazar Aranda**  
**Co-Director de Tesis**



**Dr. C. Jonathan Pérez Meseguer**  
**Comisión de Tesis**



**Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez**  
**Subdirector de Estudios de Posgrado**

**OBTENCIÓN DE COMPUESTO(S) CON ACTIVIDAD INHIBITORIA DE  $\alpha$ -GLUCOSIDASA A PARTIR DE *Schinus molle*.**

Q.C.B. Gualberto Mora Castillo

Fecha de graduación: Septiembre, 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Presentado por:

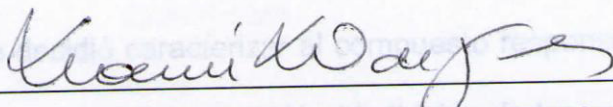
Q.C.B. Gualberto Mora Castillo

Título del  
Estudio:

OBTENCIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD INHIBITORIA  
DE  $\alpha$ -GLUCOSIDASA A PARTIR DE *Schinus molle*

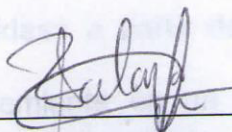
Este trabajo se desarrolló en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Laboratorio de Electrofisiología y Bioevaluación Farmacológica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección de la Dr. C. Noemí H. Waksman Minsky y la co-dirección del Dr. C. Ricardo Salazar Aranda.

Director



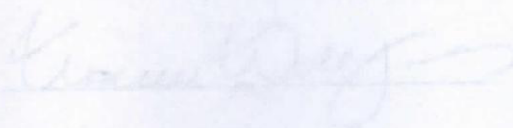
Dr. C. Noemí H. Waksman Minsky

Co-Director



Dr. C. Ricardo Salazar Aranda

FIRMA DEL ASESOR



*La ciencia no transmite la verdad absoluta. La ciencia es un mecanismo. Es una manera de mejorar su conocimiento de la naturaleza. Es un sistema para probar sus pensamientos contra el universo y ver si coinciden. Y esto funciona, no sólo para los aspectos ordinarios de la ciencia, sino para toda la vida.*

Isaac Asimov, 1988.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia que siempre me ha apoyado en casi todos mis proyectos, por ejemplo este. Mis padres, María Guadalupe y Gualberto por educarme de forma que llegué hasta este punto, algún día les pagaré todo lo que han hecho por mí. A mi hermana Alejandra que aunque no lo exprese, sé que cuento con su apoyo y ella con el mío; y especialmente a mi hermano Daniel a quien considero mi motor en la vida, y de quien son todos mis logros.

A mi comisión de tesis, no pude tener una mejor. Hay mucho de ellos en este trabajo.

A la jefa Noemí Waksman que me aceptó como su estudiante hace 5 años, y a pesar de que soy una persona difícil de tratar y muy flojo, quiero pensar que nunca dejó de creer en mí. Es como una segunda madre para mí, la admiro mucho y aunque suene trillado, cuando sea grande quiero ser como ella. Le pido disculpas si en algún momento la llegué a ofender con mi irreverencia.

A mi co-director Ricardo Salazar a quien considero un muy buen amigo con quien sé que puedo acudir a hablar de cualquier problema que se me presente sin ser juzgado a pesar de que muchas veces me haya regañado. Siempre tendrá mi respeto y mi gratitud.

Al doctor Jonathan Pérez que siempre me ayudó en mis problemas de laboratorio, investigación y recientemente en mis dudas profesionales. Gracias por apoyarme en

mis ideas locas en el proyecto que al final siempre terminaron funcionando con su gran ayuda.

Al Dr. Juan José Acevedo y a su esposa Eli que me ayudaron mucho en la parte de los análisis *in vivo* con su amplia experiencia. También por sus consejos en cuanto a este mundillo de la investigación científica, y de la vida profesional en esa rama. Los considero grandes amigos, siempre les estaré agradecido, y espero volver a verlos pronto.

A la Dr. Graciela Granados que se tomó el tiempo de enseñarme a hacer el bioensayo más importante de este trabajo y que me dio muy buenos consejos para investigación y la vida en general.

Al Dr. David Silva que me ayudó mucho en la parte de los ensayos de citotoxicidad, hizo más ameno el trabajo y lo considero más que un amigo lo considero un "compa".

Al Dr. David Paniagua, que la parte de UHPLC-MS no pudo completarse sin su valiosa ayuda en el procesamiento de las muestras e interpretación de los datos con la colaboración del Dr. Wagner Vilegas del Instituto de Biociencias de la UNESP, en Brasil; y a la T.L.C. Ivonne que me ayudó en el laboratorio y en la parte de HPLC, y que hizo más amenos muchos de los días de trabajo. Este trabajo también es de ustedes.

A mis compañeros de posgrado Marco, Perla, Fernando, Juan, Omar, Cecilia, y Marlene. Los que se fueron, Hector, Yolanda y Elda. A los que llegaron, Roberto, Sara, Dinora y Victor. Con ustedes me la pasé excelente en el cubículo.

A todos mis profesores tanto del Departamento de Química Analítica como de otros departamentos. Aprendí algo de todos ellos y eso se agradece.

A los demás miembros de Q.A., las secretarias Gloria, Jovanna y Selene, a los técnicos Julio y Marivel, y los demás que se me hayan pasado. Todos ellos me ayudaron de alguna manera.

A mis ex compañeros y amigos de Q.C.B., Churro, Aldo, Jorge, Danny, a Briones que no era de la generación pero pues se juntaba con nosotros también y es un gran amigo. A la M.A. Sonia que fue mi maestra y se volvió una estupenda amiga.

A mis mejores amigos, Israel, Iván, Hugo y Fátima que a pesar de que no entendían exactamente a qué me dedicaba, siempre me apoyaron y creyeron en mí.

A mí Aída que siempre me apoyó, hasta en la parte experimental sobremanera. Por soportar mis enojos y ataques de depresión, por estar en las buenas y en las malas. Este trabajo también es de ella.

Finalmente a Conacyt por darme dinero.

## ÍNDICE

Capítulo	Página
LISTA DE TABLAS. ....	IV
LISTA DE FIGURAS. ....	VI
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS. ....	IX
RESUMEN. ....	XII
1. INTRODUCCIÓN. ....	1
1.1. Diabetes mellitus. ....	1
1.2. La diabetes en México y en el mundo. ....	1
1.3. Consecuencias de la diabetes mellitus. ....	4
1.4. Sistemas de regulación enzimática para carbohidratos ingeridos en la dieta. ....	5
1.5. Tratamiento de T2DM. ....	8
1.6. Medicina herbal. ....	12
1.7. <i>Schinus molle</i> . ....	15
1.8. Antecedentes. ....	18
1.9. Justificación. ....	19
1.10. Objetivo general. ....	20
1.11. Objetivos específicos. ....	20
2. MATERIAL Y MÉTODOS. ....	21
2.1. Material, Equipos y Reactivos. ....	21
2.1.1. Material. ....	21
2.1.2. Equipo. ....	22



2.1.3. Reactivos. . . . .	24
2.1.4. Material biológico. . . . .	25
2.2. Colecta de material herbal. . . . .	25
2.3. Obtención de extractos primarios. . . . .	26
2.4. Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa. . . . .	26
2.5. Determinación de citotoxicidad <i>in vitro</i> . . . . .	27
2.6. Modelo <i>in vivo</i> de actividad antihiper glucemiante. . . . .	29
2.7. Obtención del compuesto o mezcla de compuestos de manera biodirigida. . . . .	30
2.7.1. Eliminación de clorofilas. . . . .	30
2.7.2. Fraccionamiento para la obtención de los compuestos bioactivos. . . . .	30
2.7.2.1. Cromatografía por permeación en gel. . . . .	30
2.7.2.2. Cromatografía de fase inversa. . . . .	31
2.8. Cromatografía en capa fina (CCF). . . . .	33
2.8.1. Sistema de elución. . . . .	33
2.9. Análisis por HPLC-DAD. . . . .	33
2.10. Caracterización por UHPLC-MS. . . . .	35
2.10.1. Análisis por infusión directa en ESI-MS. . . . .	35
2.10.2. Análisis por UHPLC-MS. . . . .	35
3. RESULTADOS. . . . .	37
3.1. Colecta de material herbal. . . . .	37

3.2.	Obtención de extracto primario. ....	37
3.3.	Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa. ....	37
3.4.	Obtención del compuesto o mezcla de compuestos de manera biodirigida. ....	38
3.4.1.	Eliminación de clorofilas. ....	38
3.4.2.	Cromatografía por permeación en gel. ....	41
3.4.3	Cromatografía de fase inversa. ....	44
3.5.	Evaluación de Citotoxicidad. ....	46
3.6.	Evaluación de la actividad antihiper glucemiante <i>in vivo</i> . .... .....	47
3.7.	Caracterización por UHPLC-MS. ....	48
3.7.1.	Análisis por infusión directa en ESI-MS. ....	48
3.7.2.	Análisis por UHPLC-MS. ....	50
4.	DISCUSIÓN. ....	58
5.	CONCLUSIONES. ....	64
6.	PERSPECTIVAS. ....	65
	BIBLIOGRAFÍA. ....	66
	AUTOBIOGRAFÍA. ....	75

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Medicamentos utilizados en el tratamiento de DM. . . . .	9
2. Plantas utilizadas en el tratamiento de diabetes, efecto farmacológico y moléculas aisladas . . . . .	13
3. Algunos compuestos aislados de plantas endémicas de México con acción inhibitoria de $\alpha$ - glucosidasa. . . . .	14
4. Administración de sustancias por grupo de ratones . . . . .	29
5. Condiciones de cromatografía por permeación en gel para el fraccionamiento de <i>Schinus molle</i> . . . . .	31
6. Condiciones de cromatografía de fase inversa para el fraccionamiento de <i>Schinus molle</i> . . . . .	32
7. Sistema de elución de la cromatografía de fase inversa. . . . .	32
8. Sistema de elución del HPLC-DAD. . . . .	34
9. Condiciones de análisis por infusión directa en ESI-MS. . . . .	35
10. Condiciones de análisis en UHPLC-MS. . . . .	36
11. Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa sobre el extracto crudo de <i>S.</i> <i>molle</i> . . . . .	37
12. Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa de las fracciones obtenidas de la eliminación de clorofilas. . . . .	40
13. Ensayo de inhibición de las subfracciones obtenidas por cromatografía por permeación en gel. . . . .	44

14. Ensayo de inhibición de las subfracciones obtenidas por cromatografía por permeación en gel. ....	46
15. Ensayo citotoxicidad de FS4. ....	46
16. Identificación de compuestos de FS4 por ESI-MS. ....	49
17. Identificación de compuestos de FS4 por UHPLC-MS. ....	53

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Número estimado de personas con diabetes en el mundo y por región en 2015 y 2040. ....	2
2. Los diez países/territorios con mayor número de adultos con diabetes. ....	2
3. Complicaciones macrovasculares y microvasculares secundarias a Diabetes Mellitus. ....	5
4. Digestión de carbohidratos . ....	6
5. Mecanismo de acción de la insulina en la captación de glucosa en la célula. ....	7
6. a) Ejemplar de <i>Schinus molle</i> , b) Racimos de frutos colgantes y hojas de <i>Schinus molle</i> . ....	15
7. Algunos compuestos identificados de <i>Schinus molle</i> . ....	16
8. Reacción de hidrólisis de p-NPG . ....	27
9. Reacción de reducción de MTT a formazán. ....	28
10. Cromatograma de la Fracción 50% MeOH. ....	39
11. Cromatograma de la Fracción 70% MeOH. ....	39
12. Cromatograma de la Fracción MeOH. ....	40
13. Cromatograma por CCF de las subfracciones obtenidas por cromatografía por permeación en gel de la fracción 50% MeOH. ...	41
14. Cromatograma de FS1. ....	42

15. Cromatograma de FS2. ....	42
16. Cromatograma de FS3. ....	43
17. Cromatograma de FS4. ....	43
18. Cromatograma por CCF de las subfracciones obtenidas por cromatografía de fase inversa de FS4. ....	45
19. Cromatograma de compuesto aislado de FS4. ....	45
20. Evaluación de la actividad antihiper glucemiante <i>in vivo</i> de FS4. Cinética completa. ....	47
21. Evaluación de la actividad antihiper glucemiante <i>in vivo</i> de FS4. Minuto 15. ....	48
22. Espectro de masas de FS4. ....	49
23. Cromatograma de estándar de Quercitrina. ....	50
24. Cromatograma de FS4 obtenido por UHPLC. ....	51
25. Espectro de masas correspondiente al $t_R$ de 2.91 minutos del cromatograma de FS4. ....	52
26. Espectro de masas correspondiente al $t_R$ de 4.70 minutos del cromatograma de FS4. ....	52
27. Espectro de masas correspondiente al $t_R$ de 7.16 minutos del cromatograma de FS4. ....	53
28. Estructura de Miricetin-3-O-glucuronido. ....	54
29. Estructura de Miquelianina. ....	54
30. Estructura de Quercitrina. ....	55
31. Cromatograma de compuesto aislado de FS4 obtenido por UHPLC. ....	56

32. Espectro de masas correspondiente al $t_R$ de 4.88 minutos del cromatograma del compuesto aislado de FS4. . . . .	56
--	----

## ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,3-difeniltetrazolium
AcOEt	Acetato de etilo
$\alpha$	Alfa
$\beta$	beta
PBS	Buffer de Fosfatos en solución salina
ButOH	Butanol
cm	centímetro
CC <sub>50</sub>	Concentración citotóxica 50
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
CCC	Cromatografía Contracorriente
VLC	Cromatografía de Líquidos a Vacío
HPLC-DAD	Cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos
CCF	Cromatografía en Capa Fina
DM	Diabetes mellitus
T1DM	Diabetes mellitus Tipo 1
T2DM	Diabetes mellitus Tipo 2
DMSO	Dimetilsulfoxido
CO <sub>2</sub>	Dioxido de carbono
DPP-IV	Dipeptidil peptidasa 4



DGE	Dirección General de Epidemiología
DMEM	Dubelcco's Modified Eagle Medium
EtOH	Etanol
rf	Factor de retardo
IDF	Federación internacional de la Diabetes
FDA	Food and Drug Administration
°C	Grado Celsius
g	gramo
h	hora
kDa	KiloDalton
kg	kilogramo
MHz	Mega Hertz
MeOH	Metanol
μL	Microlitro
μm	Micrometro
mg	Miligramo
mm	Milímetro
mM	Milimolar
min	Minuto
nm	Nanómetro
C18	Octadecilsilano
OMS	Organización Mundial de la Salud
ppm	Partes por millón

GLP-1	Peptido similar al glucagon tipo 1
p-NPG	p-Nitrofenil $\alpha$ -D-glucopiranosido
%	Por ciento
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
$^{13}\text{C}$ -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de carbono 13
$^1\text{H}$ -RMN	Resonancia Magnética Nuclear de protón
rpm	Revoluciones por minuto
GLUT-4	Transportador de Glucosa tipo 4
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

## RESUMEN

Q.C.B. Gualberto Mora Castillo

Fecha de graduación: Septiembre, 2017

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Título del  
Estudio:

OBTENCIÓN DE COMPUESTOS CON ACTIVIDAD INHIBITORIA  
DE  $\alpha$ -GLUCOSIDASA A PARTIR DE *Schinus molle*

Número de páginas: 94

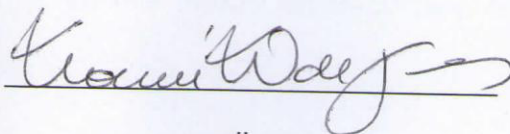
Candidato para el grado de Maestría en Ciencias  
con Orientación en Química Biomédica

Área de Estudio: Ciencias de la Salud

**Propósito y Método del Estudio:** Actualmente la T2DM es un problema de Salud Pública importante en México y en el mundo. Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa han demostrado ser efectivos en la reducción de la hiperglucemia posprandial. Debido a los antecedentes con los que contaba *Schinus molle* como inhibidor de  $\alpha$ -glucosidasa, se decidió caracterizar al compuesto responsable de dicha actividad. Este trabajo consistió en la separación biodirigida de los compuestos presentes en la hoja de esta planta utilizando el ensayo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa, para luego evaluar la actividad antihiperglucemiante en un modelo *in vivo*.

**Contribuciones y Conclusiones:** Se obtuvo y caracterizó una fracción con actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa a partir de *Schinus molle*. Dicha fracción presentó actividad antihiperglucemiante en un modelo murino. Así mismo se identificó por medio de UHPLC-MS al compuesto miquelianina como principal responsable de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa de dicha fracción.

FIRMA DEL ASESOR



## **CAPITULO 1**

### **INTRODUCCIÓN**

#### **1.1. Diabetes mellitus**

La diabetes es una enfermedad crónica que aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. El efecto de la diabetes no controlada es la hiperglucemia (aumento del azúcar en la sangre), que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas, especialmente los nervios y los vasos sanguíneos.<sup>1</sup>

#### **1.2. La diabetes en México y en el mundo.**

La Organización Mundial de la Salud y la Federación Internacional de la Diabetes reportan que hasta el 2015 entre 415 y 422 millones de personas presentaron diabetes, 44.3 millones habitan en América del Norte y el Caribe (Figura 1), y de estos, 11.5 millones eran de México; éste es además, el sexto país con mayor número de adultos que presentan esta enfermedad (Figura 2). Se estima que para el año 2040 el número de personas que presenten esta enfermedad será de 642 millones en todo el mundo. Asimismo, el número de muertes en el mundo por diabetes fue 5 millones en 2015 (Figura 1).<sup>1,2</sup>

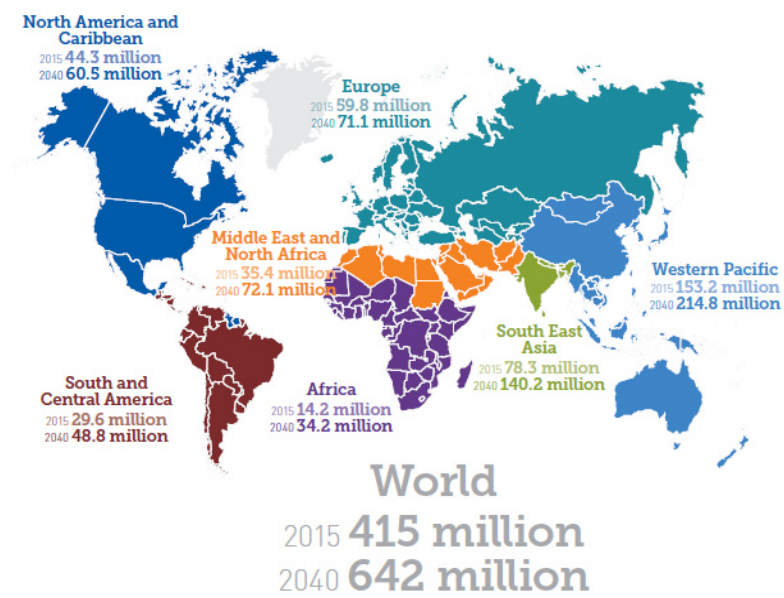


Figura 1. Número estimado de personas con diabetes en el mundo y por región en 2015 y 2040.<sup>2</sup>

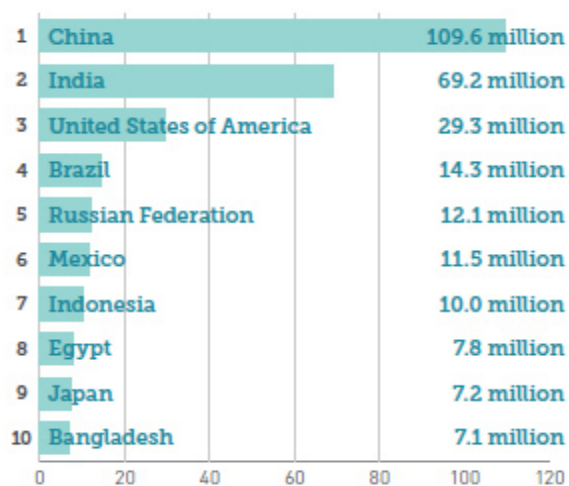


Figura 2. Los diez países/territorios con mayor número de adultos con diabetes.<sup>2</sup>

La diabetes mellitus se puede clasificar en dos grupos principales:

- Tipo 1

Se caracteriza por la producción deficiente de insulina y requiere la administración diaria de esta hormona.<sup>1</sup>

- Tipo 2

También llamada no insulino dependiente o de inicio en la edad adulta, se debe a la utilización ineficaz de la insulina.<sup>1</sup>

En México, según el boletín epidemiológico de la DGE por parte de Secretaría de Salud, en 2016, se reportaron 2843 casos de diabetes tipo 1, y a la semana 32 del año 2017, se habían reportado 1865 casos de esta enfermedad. Por otra parte, en 2016 se reportaron 365857 casos de diabetes tipo 2, y a la semana 32 del año 2017 se habían reportado 257177 casos; esta enfermedad ocupó el lugar número 12 como una de las veinte principales causas de enfermedad Nacional en México en 2015.<sup>3, 4, 5</sup>

Existe un tercer tipo de diabetes, conocido como gestacional que se caracteriza por hiperglucemia; esta afección aparece durante el embarazo y la hiperglucemia alcanza valores que, pese a ser superiores a los normales, son inferiores a los establecidos para diagnosticar una diabetes. Según la DGE de la Secretaría de Salud de México, en 2016 se presentaron 11 876 casos de este tipo de diabetes, y a la semana 32 del año 2017 se habían reportado 8 429 casos.<sup>3, 4, 5</sup>

Con base a los datos estadísticos nacionales, el presente trabajo se enfoca en la diabetes mellitus de tipo 2 debido a su alta prevalencia en el país.

### **1.3. Consecuencias de la diabetes mellitus**

Un pobre control de la glucemia y de la presión arterial, conducen a complicaciones vasculares. Estos trastornos están relacionados con la diabetes y contribuyen a la morbilidad y mortalidad de los pacientes diabéticos. Estas complicaciones se pueden presentar a nivel macrovascular, microvascular, o ambos.

Las complicaciones macrovasculares, que afectan a los vasos grandes del sistema circulatorio, pueden conducir a una incidencia de 2 a 4 veces más grande de infarto (cerebrovascular), cardiopatía coronaria (*CDH* por sus siglas en inglés), enfermedad vascular periférica que puede llevar a ulceración, gangrena, y amputación de extremidades inferiores.

Las complicaciones microvasculares involucran el daño a los vasos sanguíneos pequeños y contribuyen a la neuropatía diabética (daño a los nervios), nefropatía y retinopatía. La Figura 3 muestra un resumen de las complicaciones secundarias a diabetes mellitus y una incidencia relativa de las mismas.<sup>6</sup>

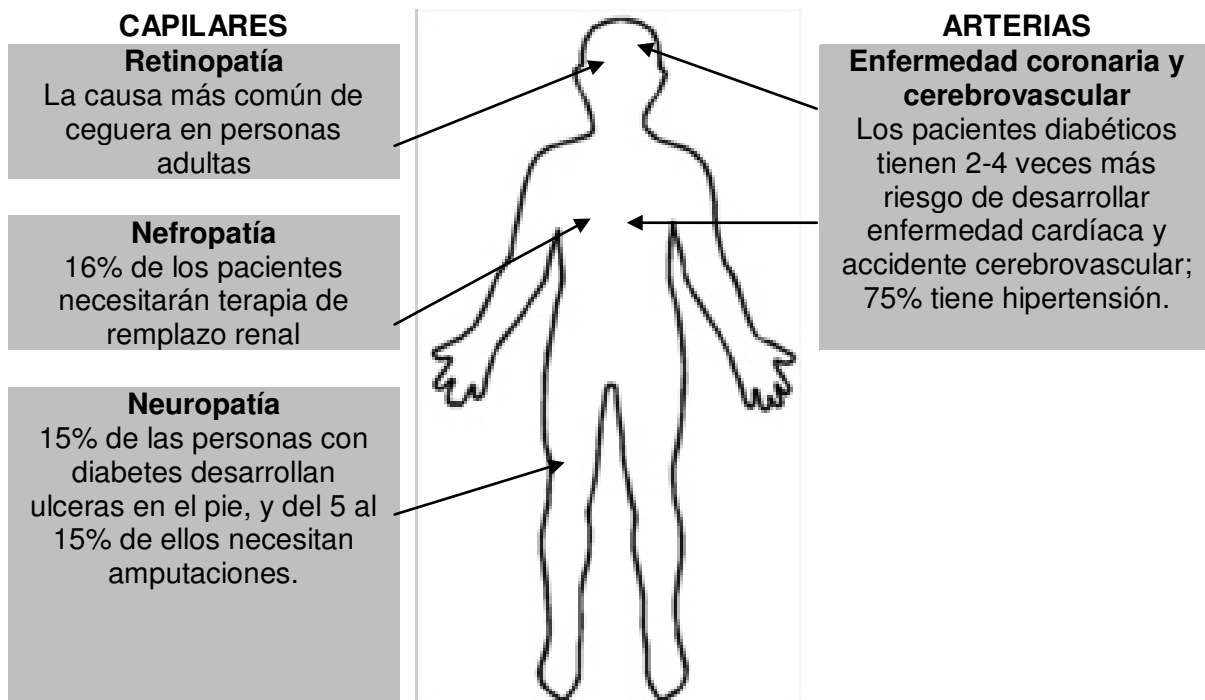


Figura 3. Complicaciones macrovasculares y microvasculares secundarias a Diabetes mellitus<sup>6</sup>

#### 1.4. Sistemas de regulación enzimática para carbohidratos ingeridos en la dieta, y absorción celular de la glucosa en sangre

Los principales sitios de digestión de los carbohidratos son la boca y la luz intestinal. Los polisacáridos de la dieta (glucógeno, amilosa, amilopectina) comienzan a ser digeridos en la boca por la  $\alpha$ -amilasa salival, una enzima de tipo endoglucosidasa que hidroliza al azar enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  glucosídicos, generando una mezcla de oligosacáridos ramificados (esto porque las ramificaciones involucran enlaces  $\alpha(1\rightarrow6)$  que no pueden ser hidrolizados por la  $\alpha$ -amilasa salival) y no ramificados cortos. Esta enzima es inactivada en el estómago por su



pH ácido; el intestino delgado continúa la digestión de los carbohidratos por parte de la  $\alpha$ -amilasa pancreática. Los procesos digestivos finales se llevan a cabo en el revestimiento mucoso del yeyuno posterior por la acción de varias disacaridasas unidas en el lado luminal de las membranas de las células de dicho revestimiento (isomaltasa, maltasa, sacarasa, lactasa y trealasa), para que después, los monosacáridos resultantes (glucosa, fructosa, galactosa) sean absorbidos por las células de la mucosa intestinal (específicamente del duodeno y la parte alta del yeyuno), y luego ser transportados hacia la circulación portal (Figura 4).<sup>7</sup>

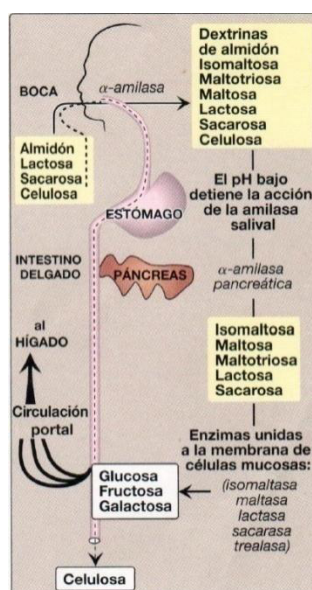


Figura 4. Digestión de carbohidratos<sup>7</sup>

La glucemia constituye una señal para desencadenar la secreción de insulina. La insulina es una hormona peptídica de 5.8 KDa, secretada por las células  $\beta$  en los islotes pancreáticos de Langerhans en respuesta a niveles elevados de nutrientes en la sangre; en este caso, a la glucosa, ya que su función principal es mantener la concentración de ésta en un rango normal, promoviendo su captación,

y almacenamiento, e inhibiendo la glucogenólisis y la gluconeogénesis. La insulina se une a la subunidad  $\alpha$  del receptor específico de alta afinidad de la membrana celular de la mayoría de los tejidos, lo que lo activa, promoviendo el reclutamiento de transportadores de glucosa (GLUT-4) desde el depósito intracelular hasta la membrana celular, los cuales se encargarán así de la captación de glucosa hacia dentro de la célula (Figura 5).<sup>7, 8</sup>

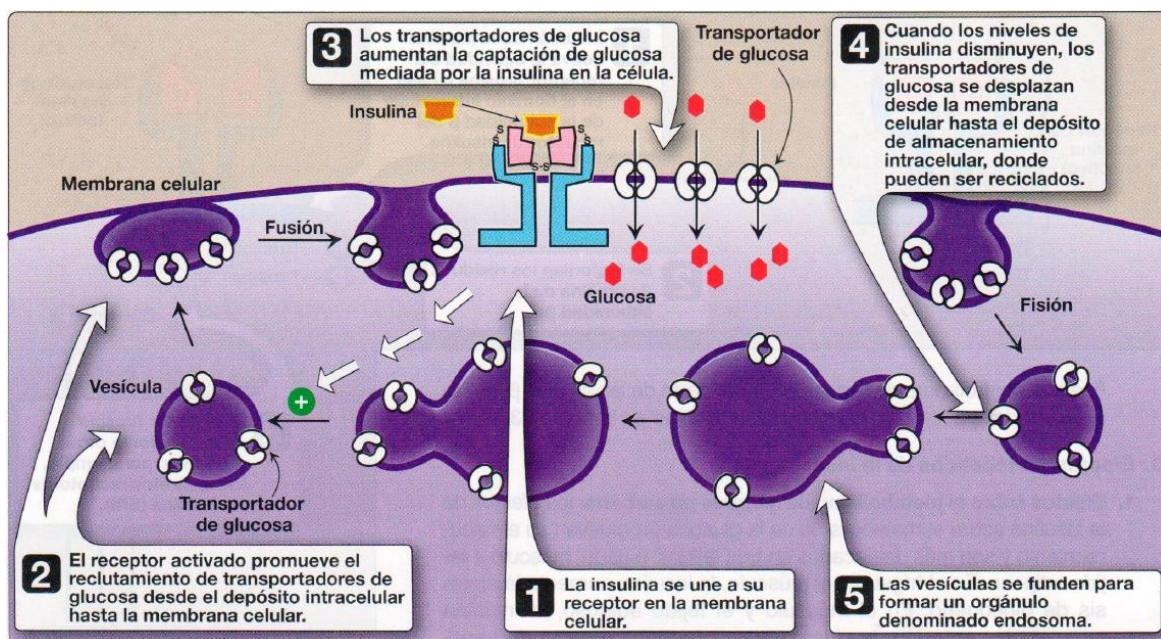


Figura 5. Mecanismo de acción de la insulina en la captación de glucosa en la célula<sup>7</sup>

La T2DM se caracteriza por la síntesis insuficiente de insulina y su secreción, secundaria a resistencia a la insulina. Es normalmente diagnosticada después de la cuarta década de vida. Se divide en dos subgrupos, diabetes con obesidad, y sin obesidad. Las personas con T2DM con obesidad usualmente desarrollan

resistencia a la insulina endógena debida a alteraciones en receptores celulares, y esto es asociado a la distribución de grasa abdominal. En las personas con T2DM no obesas hay una resistencia a la insulina, aunado a una deficiencia en la producción y liberación de esta hormona.<sup>8</sup>

### **1.5. Tratamiento de T2DM**

La T2DM es tratada con un control de la glucemia a niveles moderados, con ciertos fármacos y con modificaciones en el estilo de vida del paciente con terapia nutricional y con actividad física así como un control de la tensión arterial. Como esta enfermedad se caracteriza generalmente por resistencia a insulina, se debe recurrir a agentes que actúen sobre otro blanco terapéutico. Con base a la ruta de los carbohidratos presentada en la sección 1.4, en la tabla 1 se describen los principales fármacos antidiabéticos que actualmente se encuentran en el mercado.<sup>9</sup>

Tabla 1. Medicamentos utilizados en el tratamiento de DM <sup>9, 10, 11</sup>

<b>Categoría</b>	<b>Sub-categoría</b>	<b>Tipos y/o ejemplos</b>	<b>Mecanismo de acción</b>	<b>Efectos adversos</b>
Oral	Promotores de secreción de insulina	Sulfonilureas (De primera generación: tolbutamida, clorpropamida y acetohexamida; y de segunda generación: glimepirida, glibenclamida/ gliburida, gliclazida y glipizida.	Se unen a su receptor en las células $\beta$ del páncreas, que lo cual estimula la secreción de insulina.	El efecto más común es la hipoglucemia, especialmente en adultos mayores. El aumento de peso también puede presentarse.
		Meglitinidas (repaglinida y nateglinida).	Tienen el mismo efecto que las Sulfonilureas pero se unen a un sitio diferente en el mismo receptor.	Ganancia de peso, hipoglucemia, y que debe ser tomado forzosamente con los alimentos.
	Sensibilizadores de insulina	Biguanidas (Metformina y fenformina)	Aumenta la sensibilidad a insulina sobre el hígado y tejidos periféricos.	Disfunción renal debido a que puede incrementar el riesgo de acidosis láctica.
		Tiazolidinedionas (Pioglitazona y rosiglitazona)	Actúan sobre tejido adiposo, músculo e hígado incrementando el uso de glucosa y disminuyendo la producción de la misma, aumentando la sensibilidad	Ganancia de peso, edema, un posible aumento de los niveles de ALT, anemia debida a hemodilución y riesgo de fractura en sitios atípicos. Recientemente se reportó riesgo de cáncer de vejiga luego de un año de trata-

			a la insulina.	miento con pioglitazona.
	Inhibidores de $\alpha$ -glucosidasa	Acarbosa y miglitol	Bloquean a $\alpha$ -glucosidasa, previniendo que los monosacáridos sean absorbidos al torrente sanguíneo.	Flatulencias, debido a que los carbohidratos no digeridos alcanzan la parte inferior del intestino, donde los gases son producidos por flora bacteriana. También provoca diarrea e inflamación intestinal.
	Inhibidores de dipeptil peptidasa IV	Vildagliptina, saxagliptina y sitagliptina.	Al inhibir la actividad de DPP-IV, GLP-1 no es inactivada. GLP-1 se encarga de inducir la secreción de insulina e inhibir la de glucagón.	Predisposición a nasofaringitis o infección del tracto respiratorio superior, dolores de cabeza, infección del tracto urinario, y mareos.
Inyectable	Análogos de GLP-1	Exenatida, liraglutida.	Actúan como GLP-1 escapando de la degradación por DPP-IV	Nausea y vómito, y en algunos casos pancreatitis.
	Análogo de amilina	Pramlintida	Retrasa el vaciamiento gástrico, suprime la secreción de glucagón y disminuye el apetito.	Nausea e hipoglucemia.
	Promueve síntesis de	Convencional (Insulina regular,	Promueve la absorción de	Hipoglucemia, ganancia de

	GLUT-4	o NPH)	glucosa desde el torrente sanguíneo al unirse a su receptor específico	peso, edema, hipotensión ortostática, lipohipertrofia, y alergia a la insulina.
		Análogos <ul style="list-style-type: none"> <li>- De acción rápida (lispro, aspart, glulisina)</li> <li>- De acción prolongada (Glargina, detemir)</li> </ul>		

Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa han sido ampliamente investigados debido a que han demostrado ser efectivos en la supresión de la hiperglucemia postprandial, ya que pueden retrasar la liberación de glucosa de carbohidratos complejos de la dieta, lo que retarda su absorción. Consecuentemente, los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa son útiles previniendo la progresión de la T2DM y para el tratamiento de condiciones prediabéticas.<sup>12, 13, 14</sup>

## **1.6. Medicina herbal**

La medicina tradicional, es la suma total de los conocimientos, capacidades y prácticas basados en las teorías, creencias y experiencias propias de diferentes culturas, bien sean explicables o no, utilizadas para mantener la salud y prevenir, diagnosticar, mejorar o tratar enfermedades físicas y mentales. Es reconocida como un recurso fundamental para la salud de millones de seres humanos. La riqueza y diversidad de la flora es una fuente única de medicinas potenciales.<sup>15, 16</sup>

La medicina herbal se define como la “práctica que utiliza a uno o varios productos derivados de una planta, con fines curativos”, sus productos han sido extensamente utilizados alrededor del mundo por ser considerados de bajo riesgo comparados algunos de los muchos fármacos de origen sintético, por lo que ha surgido como alternativa a los efectos adversos de dichas sustancias. Según un análisis realizado por Patridge, E. y colaboradores en 2015, se estimó que de los productos naturales y sus derivados aprobados por la FDA como nuevas entidades moleculares, el 25% provienen directa o indirectamente de plantas<sup>17, 18,</sup>

19, 20, 21

La medicina tradicional ha sido utilizada por miles de años para tratar y controlar la diabetes y sus complicaciones con una relativamente baja incidencia de efectos adversos en muchas culturas étnicas como en China, Corea, India y México. Dicho sea de paso, hay una gran cantidad de información que incluye química medicinal, etnofarmacología, y ensayos clínicos que explican y apoyan el uso clínico de las plantas en el tratamiento de esta enfermedad. Un segmento

significativo de la población cree que el tratamiento con plantas es más seguro y menos costoso que el tratamiento alópata. La tabla 2 muestra algunas plantas utilizadas en el tratamiento de diabetes y algunos de sus efectos farmacológicos.<sup>22</sup>

Tabla 2. Algunas plantas utilizadas en el tratamiento de diabetes, efecto farmacológico relacionado con dicha enfermedad y moléculas aisladas.<sup>22</sup>

<b>Nombre científico</b>	<b>Efecto farmacológico</b>	<b>Moléculas aisladas</b>
<i>Panax ginseng</i> <sup>23</sup>	Incrementa la secreción de insulina, inhibió la producción hepática de glucosa.	Ginsenosido Rh2, panaxan B y el ginsenosido Rg1
<i>Momordica charantia</i> <sup>24, 25, 26</sup>	Suprime a la glucosa-6-fosfato y a la fructosa-1,6-bisfosfatasa incrementando el contenido de glucógeno en el hígado y estimulando la secreción de insulina. Suprime hiperglucemia postprandial, e inhibían la actividad de $\alpha$ -glucosidasa.	Glucosidos triterpeno tipo cucurbitano.
<i>Morus alba</i> <sup>27, 28, 29</sup>	Las hojas suprimen la hiperglucemia postprandial e inhiben la actividad de $\alpha$ -glucosidasa.	1-deoxynojirimicina
<i>Ganoderma lucidum</i> <sup>30</sup>	Efectos inhibitorios sobre la actividad de $\alpha$ -glucosidasa.	SKG-3
<i>Trigonella foenum-graecum</i> <sup>31</sup>	Suprimen hiperglucemia postprandial e inhiben la actividad de $\alpha$ -glucosidasa y $\alpha$ -amilasa.	GII
<i>Curcuma oblonga</i> <sup>32, 33</sup>	Inhiben la actividad de $\alpha$ -amilasa, y $\alpha$ -glucosidasa.	Bisdemetoxicurcumina
<i>Camellia sinensis</i> <sup>34, 35</sup>	Inhiben la actividad de $\alpha$ -glucosidasa. Se incrementó la producción de GLUT-4 con un extracto acuoso en adipocitos.	EGCG y ECG



En México se han inventariado más de 4 500 plantas medicinales y un porcentaje considerable de la población las ha utilizado para el alivio de sus enfermedades. De éstas, existen al menos 383 especies de plantas utilizadas para el tratamiento de T2DM, pero sólo una pequeña cantidad ha sido investigada para probar su eficacia pre clínica o clínica.<sup>12</sup>

Para el 2013 sólo 38 especies habían sido analizadas por su actividad inhibitoria de la  $\alpha$ -glucosidasa, aislándose nuevos inhibidores de seis de ellas, y de las cuales sólo tres crecen en el país. En la tabla 3 se presentan estas plantas y los compuestos aislados de estas que presentaron inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa.<sup>12</sup>

Tabla 3. Algunos compuestos aislados de plantas endémicas de México con acción inhibitoria de  $\alpha$ - glucosidasa<sup>12</sup>

Nombre científico	Compuesto aislado
<i>Ligusticum porteri</i>	(Z)-3-butilideneftalido
<i>Brickellia cavanillesii</i>	6-hidroxiacetil-5-hidroxi-2,2-dimetil-2H-cromeno Caleina C Isorhamnetina Quercetina
<i>Hintonia latiflora</i>	7-metoxi-5,3',4'-trihidroxi-4-fenilcumarina

### 1.7. *Schinus molle*

*Schinus molle*, conocido en México como “pirú” o “pirul” es un árbol de la familia Anacardiaceae que es nativo en las regiones subtropicales de Sudamérica, aunque actualmente se encuentra en otras regiones. Varias partes del Pirul han sido utilizadas en el tratamiento de diversos malestares como amenorrea, bronquitis, gingivitis, tuberculosis, úlceras, uretritis, enfermedades venéreas, entre otras. Los frutos y hojas (Figura 6) de esta planta contienen compuestos bioactivos con propiedades farmacológicas. Se han identificado muchos de estos compuestos, 46 de ellos en el aceite esencial obtenido por destilación a vapor de su fruto que incluye: 9 monoterpenos, un compuesto aromático, un éster alifático, 2 ésteres monoterpenos, 16 sesquiterpenos y otros 17 sesquiterpenoides. En la Figura 7 se muestran algunos de los compuestos identificados de *Schinus molle*.<sup>36, 37, 38</sup>



Figura 6. a) Ejemplar de *Schinus molle*, b) Racimos de frutos colgantes y hojas de *Schinus molle*<sup>36</sup>

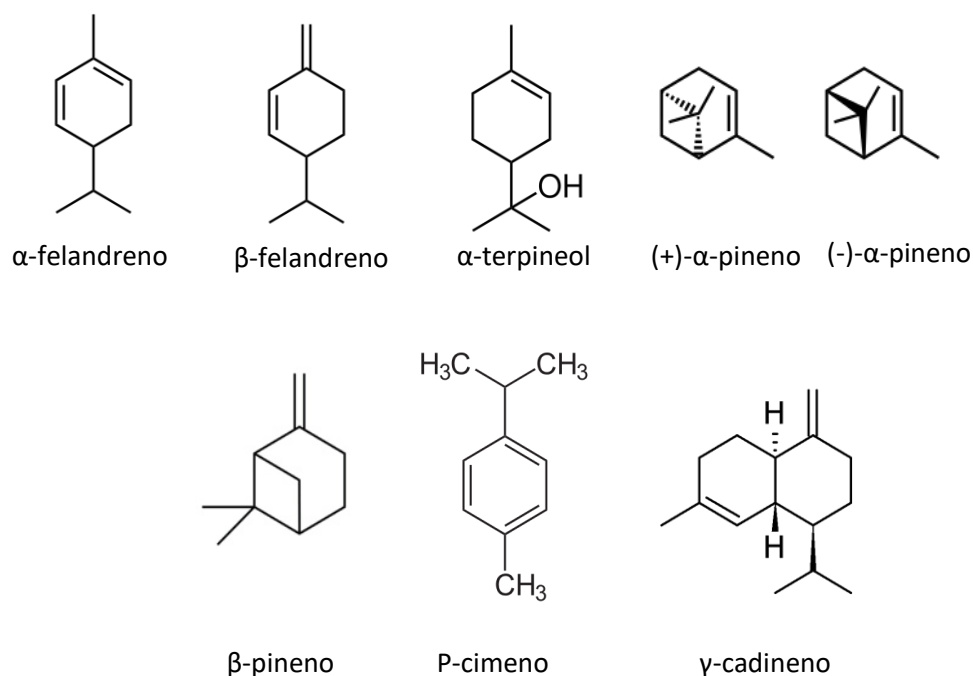


Figura 7. Algunos compuestos identificados de *Schinus molle*<sup>36</sup>

La mayor parte de los estudios de la planta han sido sobre los aceites esenciales los cuales han exhibido actividad biológica como antimicrobiana, antioxidante, e insecticida.<sup>39, 40</sup>

Algunos estudios sobre extractos obtenidos de la planta mostraron actividad biológica; el extracto metanólico demostró actividad antioxidante y anticáncer, el etanólico actividad antidepresiva, el hexánico actividad inhibitoria de acetilcolina, y el extracto con diclorometano acción inhibitoria de la enzima convertidora de angiotensina (ECA).<sup>41, 42, 43, 44, 45</sup>

En 2007, Huerta y colaboradores estudiaron la actividad inhibitoria sobre  $\alpha$ -amilasa y las disacaridasas intestinales de rata (maltasa y sacarasa) de extractos acuosos y sus residuos de diversas plantas, entre ellas *Schinus molle*; el residuo

digerido de esta planta mostró un porcentaje de inhibición de  $\alpha$ -amilasa del 65% y el extracto acuoso mostró un porcentaje de inhibición de la sacarasa de un 17%. Así mismo en 2008, Galvez y colaboradores investigaron diversas plantas utilizadas comúnmente en la medicina tradicional como potenciales inhibidores de enzimas relevantes en el control de hiperglucemia; el extracto acuoso de *Schinus molle* mostró moderada actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa.<sup>46, 47</sup>

En la revisión bibliográfica que se ha llevado a cabo, no se ha encontrado ningún reporte sobre compuestos identificados de *Schinus molle* relacionados con su actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro*; ni se han reportado estudios *in vivo* de su potencial farmacológico en el tratamiento de la Diabetes mellitus Tipo 2.

### 1.8. Antecedentes

En el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L se demostró que las subfracciones de la partición líquido-líquido de acetato de etilo y butanol del extracto metanólico de las hojas de *Schinus molle* mostraron muy buena actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro*. En una colaboración con el Laboratorio de Electrofisiología y Bioevaluación Farmacológica de la Facultad de Medicina de la U.A.E.M. se realizaron estudios *in vivo* de las mismas fracciones en un modelo murino normoglucémico por administración vía intraperitoneal; la fracción de acetato de etilo mostró mejor actividad de reducción de la glucemia, lo cual sugirió el potencial farmacológico de este extracto. <sup>48</sup>

### 1.9. Justificación

La diabetes mellitus de tipo 2 es una enfermedad de alta prevalencia en México y en el mundo, con una incidencia en aumento, y con consecuencias graves para quien la padece. La disminución de la glucemia postprandial ha sido un blanco terapéutico recurrente para esta enfermedad y los fármacos utilizados, a pesar de ser efectivos, generan una serie de efectos adversos al paciente. Debido a esto es necesario encontrar nuevos fármacos que se utilicen sobre este blanco para el tratamiento de la T2DM. El uso de plantas medicinales ha surgido como una alternativa a los efectos adversos de distintos medicamentos, entre ellos los utilizados para tratar la diabetes mellitus. A pesar de que se tienen estudios de la actividad de *Schinus molle* como fuente potencial de compuestos con actividad antidiabética, los estudios no son concluyentes y es necesario conocer el o los compuestos responsables de la misma.

### **1.10. Objetivo General**

Obtener y caracterizar el o los compuestos con actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa a partir de *Schinus molle*.

### **1.11. Objetivos Específicos**

1. Establecer un método para la obtención del compuesto o mezcla de compuestos de *Schinus molle* con actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa.
2. Evaluar la actividad biológica del compuesto o mezcla de compuestos obtenidos mediante:
  - a. Ensayo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro*.
  - b. Ensayo de citotoxicidad en línea celular Vero.
  - c. Actividad antihiper glucemiante *in vivo*.
3. Caracterizar el compuesto o mezcla de compuestos obtenidos mediante técnicas espectroscópicas y/o espectrométricas.

## **CAPITULO 2**

### **MATERIAL Y MÉTODOS**

#### **2.1. Material, equipos y reactivos**

##### **2.1.1. Material**

- Agitadores de vidrio
- Columna Hypersil GOLD
- Cajas de cultivo celular
- Capilares
- Cartucho de SPE C18 Extra Clean High Capacity 100mg/75mL Alltech
- Columna HPLC fase inversa de C18 Hypersil GOLD 15.0x4.6cm 5um Thermo Scientific
- Cromatofolios de sílica gel 60F254 20x20 Merck
- Embudo Hirsch Pyrex
- Espátulas para polvos
- Frascos de vidrio ámbar de boca ancha con tapa de plástico
- Gradillas
- Licuadora de 10 velocidades Man
- Matraces bola con boca esmerilada 24/40 de 100, 250 y 500mL Pyrex
- Matraces Erlenmeyer de 250, 500 y 1000 mL Pyrex
- Matraces Kitazato de 500 y 1000 mL Pyrex



- Papel filtro
- Pipetas automáticas Finnpiquette F2 de 2-20, 20-200, y 100-1000 uL, Thermo Scientific
- Pipetas pasteur
- Placas de 96 pozos, Falcon
- Placas de porcelana de 12 pozos
- Probetas 10, 50, 100, 250 y 500 mL
- Puntillas de 100-1000, 20-200 y 1-20
- Tubos conicos de 15 y 50mL Corning
- Tubos de ensayo 13x100 Pyrex
- Tubos claros de 1.5mL Eppendorf
- Vasos de precipitado 50, 150, 250 mL
- Viales de vidrio 5mL

#### 2.1.2. Equipo

- Autoclave
- Balanza analítica, Modelo Pioneer, Ohaus
- Baño de ultrasonido, Branson 2510
- Bomba de vacío, Modelo DOA-P704-AA con presión máxima de 6psi, GAST
- Campana de extracción
- Campana de flujo laminar
- Cromatografo contracorriente, Dynamic Extractions
- Detector Agilent Technologies 1260 infinity

- Detector: Thermo Scientific LCQ Fleet Ion Trap LC/MSn
- Enfriador y recirculador
- Espectrómetro de RMN, modelo Avance III HD de 400 MHz, equipado con gradiente de campo, sonda de 5mm de detección directa, Bruker
- Evaporador analítico Zantek, modelo Zipvap, Glas-Col
- Glucómetro Accu-Chek® Performa
- Horno de calentamiento
- HPLC Waters 600 con automuestreador Waters 717 Plus y detector de arreglo de diodos Waters 2996
- Incubadora CO<sub>2</sub> MIDI40 Thermo Scientific
- Invertoscopio Southern Precision Unstrument
- Lámpara Ultravioleta
- Lector de placas, Modelo Multiskan FC, Thermo Scientific
- pH metro ø60, Beckman
- Placa de calentamiento y agitación, Modelo Ceramag Midi, IKA
- Rotavapor, modelo Unimax 1010, Heidolph
- Shaker
- Tiras reactivas Accu-Chek® Performa
- UHPLC Dionex Ultimate 3000, Standard Systems, Thermo Scientific
- Vortex VWR Scientific Products

### 2.1.3. Reactivos

- Acarbosa  $\geq 95\%$ , Sigma-Aldrich
- Acetato de etilo ACS, Fermont
- Acetona 94.874%, CTR
- Acido acético glacial ACS, Fermont
- Acido fórmico 88%, Fermont
- Agua bidestilada, Laboratorios Monterrey, S.A. de C.V.
- Agua destilada, Laboratorios Monterrey, S.A. de C.V.
- Albúmina Sérica Bovina, Fracción V, 96-99%, Sigma-Aldrich
- Bromuro de tiazol azul tetrazolium MTT, 97.5%, Sigma-Aldrich
- Carbonato de sodio  $\geq 99\%$ , Sigma-Aldrich
- Dimetil sulfóxido
- Etanol ACS, CTR
- Fosfato dibásico de potasio 99%, Sigma-Aldrich
- Fosfato monobásico de potasio. 99.2% Fisher Scientific
- Hexano ACS, CTR
- LiChroprep RP-18 (40-63  $\mu\text{m}$ )
- Medio Dubelcco's Modified Eagle Medium DMEM Advanced
- Metanol (HPLC)
- Metanol ACS, Fermont
- Metanol-d4 100%
- Nitrogeno gas de alta pureza grado 5.0, Praxair
- p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, Sigma-Aldrich

- Sephadex LH-20, Sigma-Aldrich
- Silica gel
- $\alpha$ -glucosidasa, 12.4 U/mg. Sigma-Aldrich

#### 2.1.4. Material biológico

- Línea celular Vero (de células epiteliales de riñón de mono verde africano)
- Ratas Wistar macho normoglucémicas

## 2.2. Colecta de material herbal

La colecta de *Schinus molle* se llevó a cabo el mes de julio de 2016 en el municipio de Arteaga, del estado de Coahuila de Zaragoza. Se obtuvo únicamente la parte aérea de la planta.

El material colectado se puso a secar a temperatura ambiente hasta que su peso fue constante, posteriormente se envió un espécimen al Herbario Institucional de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. para su autenticación, quedando registrado con el número 024166; se molieron, pesaron y almacenaron sólo las hojas del espécimen autenticado.

## 2.3. Obtención de extractos primarios

Se obtuvieron extractos metanólicos de las hojas molidas de *Schinus molle*. Para ello se pesaron 100g de material y se extrajo con 500 mL de MeOH, agitando durante 3 horas, se dejó reposando por 15 minutos y se filtró. Este proceso se realizó por

triplicado. El líquido filtrado fue sometido a destilación a presión reducida a una temperatura controlada de 37°C hasta obtener un extracto seco, el cual fue almacenado a 4°C.

## **2.4. Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa**

Se realizó el método espectrofotométrico a microescala descrito por Granados-Guzman en su tesis de doctorado de 2017 descrito a continuación:

Se pesó 1 mg de la muestra y se disolvió en 500  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos (100 mM, pH 6.8). Se mezclaron 33  $\mu$ L de la solución anterior (20.6 a 660  $\mu$ g/mL) y 17  $\mu$ L de p-NPG (33.6  $\mu$ g/mL) y se incubó por 5 min a 37°C. Posteriormente se agregaron 17  $\mu$ L de enzima  $\alpha$ -glucosidasa 0.55 U/mL y se incubó por 17.5 minutos a 37°C. Finalmente se agregaron 133  $\mu$ L de Carbonato de Sodio 100 mM. Se midió la absorbancia en un lector de placas a 405 nm. En cada experimento se incluyó un control del 100% de actividad enzimática, en el que se colocaron 33  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos 100 mM pH 6.8, en lugar de muestra o estándar. Así mismo se incluyó un blanco de muestra o estándar, que no contenía enzima, si no 17  $\mu$ L de amortiguador. El valor de absorbancia del blanco de muestra o estándar se restó a los valores de absorbancia de su muestra o estándar. El porcentaje de inhibición enzimática se calculó con base a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inhibición enzimática} = 100 - \left[ \frac{(\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco})}{\text{Abs control del 100\%}} \times 100 \right]$$

Mediante este método se mide la capacidad de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa para hidrolizar enlaces  $\alpha(1\rightarrow4)$  glucosídicos, en este caso del sustrato p-Nitrofenil- $\alpha$ -D-glucopiranosido, y cuya reacción enzimática se presenta a continuación (Figura 8):

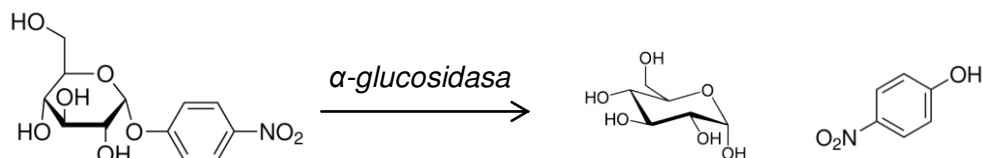


Figura 8. Reacción de hidrólisis de p-NPG

El p-nitrofenol es el compuesto cuya absorbancia es medida a 405nm. Una menor absorbancia significa un menor porcentaje de la actividad enzimática, y por tanto, una inhibición de la actividad.

## 2.5. Determinación de citotoxicidad *in vitro*

La evaluación de la citotoxicidad se determinó por el método de reducción de método MTT en la línea celular Vero. Para el ensayo se adicionaron en placas de 96 pozos, 5000 células/pozo. Transcurridas 24 h se agregaron 100  $\mu$ L del compuesto a probar disuelto en medio de cultivo a concentraciones de 500, 125, 62.5, 31.25 y 15.62  $\mu$ g/ml. Se incubaron las células por 48 h y posteriormente se realizaron dos lavados con PBS. Seguido de los lavados se agregaron 200  $\mu$ L de MTT 0.5 mg/mL disuelto en medio de cultivo y se incubaron durante 3 hrs a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez transcurrido el

tiempo, se decantó el sobrenadante y se añadieron 200  $\mu\text{L}$  de DMSO, se agitó y se midió la absorbancia espectrofotométricamente a 540 nm en un lector de placas. Como control positivo se empleó doxorubicina a 5, 0.5 0.05 y 0.005  $\mu\text{g/mL}$  y como control negativo medio de cultivo.

Este método se basa en la reducción de MTT a cristales de formazán por las deshidrogenasas y agentes reductores presentes en células metabólicamente activas por la reacción presentada en la Figura 9.

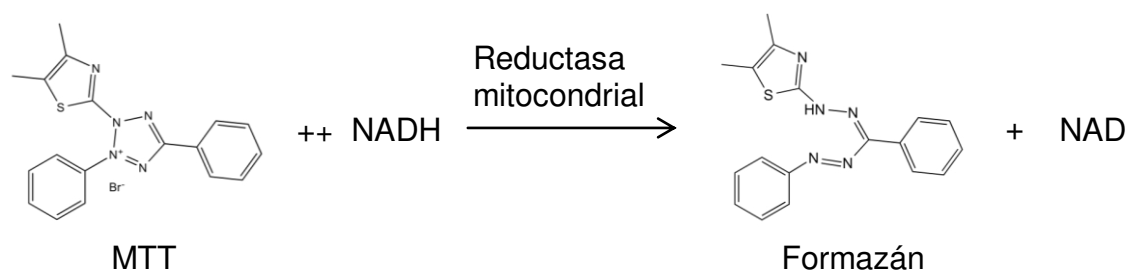


Figura 9. Reacción de reducción de MTT a formazán

Los cristales se acumulan en las células y luego de ser solubilizados, se miden espectrofotométricamente. La “cantidad” de cristales de formazán formados, o un aumento en la absorbancia es proporcional al número de células vivas.

## 2.6. Modelo *in vivo* de actividad antihiper glucemiante

Se realizaron estudios *in vivo* con ratas Wistar macho normoglucémicas por administración vía oral.

A un grupo de ratas sanas (n= 5) en ayuno de 12 horas, se les midió la glucemia basal por el método de glucosa-oxidasa utilizando un glucómetro Accu-Chek® Performa, extrayendo sangre de la punta de la cola. Posteriormente se les administró vía oral las sustancias de acuerdo a la tabla 4:

Tabla 4. Administración de sustancias por grupo de ratones.

<i>Control de vehículo o blanco</i>	Agua
<i>Control de hiperglucemia</i>	Almidón de maíz en agua
<i>Control positivo</i>	Almidón de maíz en agua, e inhibidor (Acarbosa) (Dosis de 0.5 mg/kg)
<i>Muestra</i>	Almidón de maíz en agua, e inhibidor (extracto) (Dosis de 0.5 y 5.0 mg/kg)

Luego de la administración de las sustancias antes mencionadas, se les midió la glucemia en los minutos 15, 30, 45, 60 y 120; con los datos obtenidos se graficaron los niveles de glucemia (normalizada) en función del tiempo.



## **2.7. Obtención del compuesto o mezcla de compuestos de manera biodirigida**

### **2.7.1. Eliminación de clorofilas**

Se eliminaron las clorofilas mediante la técnica de extracción en fase sólida a vacío, a temperatura ambiente, con un cartucho de octadecilsilano (C18). Para ello se pasaron por el cartucho 10 mL del extracto primario y se realizó la elución con 80 mL de mezclas de metanol-agua en tres concentraciones: 50, 70, y 100% v/v. Cada una de las tres fracciones se sometió a destilación a presión reducida y se almacenó el extracto seco de cada una a 4°C.

A las tres fracciones obtenidas se les determinó la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro* (según lo descrito en la sección 2.4).

### **2.7.2. Fraccionamiento para la obtención de los compuestos activos**

#### **2.7.2.1. Cromatografía por permeación en gel**

El fraccionamiento se llevó a cabo mediante cromatografía por permeación en gel, utilizando gel dextrano de la marca Sephadex® LH-20 de Sigma-Aldrich (límite de exclusión de 4 000 - 5 000) en metanol alcanzando un volumen medio aproximado de 3.9-4.1 mL/g de polvo seco, según las especificaciones del fabricante. Las condiciones de la técnica se muestran en la tabla 5.

Tabla 5. Condiciones de cromatografía por permeación en gel para el fraccionamiento de *Schinus molle*.

Fase estacionaria	Gel dextrano
Fase móvil	Metanol
Dimensiones de columna (Largo × Ancho)	28×1.2 cm
Concentración de muestra (mg/mL)	714
Volumen de muestra (mL)	0.28

A cada una de las fracciones obtenidas se le evaluó su actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro*.

#### 2.7.2.2. Cromatografía de fase inversa

Se realizó un fraccionamiento de FS4 en las condiciones presentadas en la tabla 6 y el sistema de elución indicado en la tabla 7.

Tabla 6. Condiciones de cromatografía de fase inversa para el fraccionamiento de *Schinus molle*.

Fase estacionaria	Octadecilsilano
Fase móvil	Metanol:Agua
Dimensiones de columna (Largo × Ancho)	24×1.0 cm
Concentración de muestra (mg/mL)	40
Volumen de muestra (mL)	0.5
Flujo (mL/min)	1.0

Tabla 7. Sistema de elución de la cromatografía de fase inversa.

Tiempo (min)	% A Agua	%B MeOH
0	70	30
45	60	40
90	50	50
135	0	100

## **2.8. Cromatografía en capa fina (CCF)**

Se utilizaron cromatofolios base aluminio de sílica gel 60F<sub>264</sub> los que se cortaron del ancho necesario por 10 cm de altura. Las placas se observaron bajo luz ultravioleta a 254 nm.

### **2.8.1. Sistema de elución**

El sistema de elución estaba formado por una mezcla de acetato de etilo (AcoEt): Ácido Fórmico: Ácido acético: Agua en una proporción de 25:1:1:2.

## **2.9. Análisis por HPLC-DAD**

Como segunda técnica de seguimiento del proceso de purificación se utilizó la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), una columna Hypersil Gold 150x4.6 mm de fase inversa octadecilsilano (C18), con un tamaño de partícula de 5 µm de la marca Thermo Scientific. Se inyectaron 10 µL de muestra disuelta en MeOH. El sistema de elución se muestra en la tabla 6. La fase móvil se formó por mezcla de ácido fórmico al 0.1% en agua, y MeOH; se desgasificó y filtró con una membrana de tamaño de poro de 0.45 µm, el caudal de la fase fue de 0.4 mL/min. Antes de la primera inyección la columna se acondicionó por una hora con la fase móvil en las condiciones iniciales, los últimos diez minutos del sistema de elución fueron para volver a equilibrar la columna antes de la siguiente inyección.

Tabla 8. Sistema de elución del HPLC-DAD.

Tiempo (min)	%A 0.1% Ácido Fórmico	%B MeOH
0	70	30
20	40	60
25	30	70
30	30	70
40	70	30
45	70	30

## 2.10. Caracterización por UHPLC-MS

### 2.10.1. Análisis por infusión directa en ESI-MS

Se realizó el análisis por infusión directa en el detector LCQ Fleet Ion Trap LC/MS<sup>n</sup> de la marca ThermoScientific, en las condiciones presentadas en la Tabla 7.

Tabla 9. Condiciones de análisis por infusión directa en ESI-MS.

Modo	Negativo
Velocidad de flujo (μL/min)	10
T° de capilar (°C)	280
Concentración de muestra (mg/mL)	5

Se identificaron los iones moleculares obtenidos con base a su patrón de fragmentación, y a una búsqueda exhaustiva con ayuda de la base de datos “KNAPSAck” del Instituto de Ciencia y Tecnología de Nara (NAIST por sus siglas en inglés), y posteriormente con otras diversas bases de datos.

### 2.10.2. Análisis por UHPLC-MS

Se realizó el análisis en un UHPLC modelo Dionex Ultimate 3000 (Standard Systems) de la marca ThermoScientific, con columna Hypersil GOLD 50 x 2.1 mm 1.9 μm de octadecilsilano (C18) y un detector LCQ Fleet Ion Trap LC/MS<sup>n</sup> de la marca ThermoScientific, y con el sistema de elución mencionado en la Tabla 6 y las

condiciones presentadas en la tabla 8. Los espectros de masas se adquirieron en modo negativo.

Tabla 10. Condiciones de análisis en UHPLC-MS.

Condiciones cromatográficas	Volumen de inyección	1.0 $\mu$ L
	Temperatura de la columna ( $^{\circ}$ C)	30
	Concentración de muestra (mg/mL)	1
Condiciones de espectrometría de masas	Fuente	ESE
	T $^{\circ}$ de capilar ( $^{\circ}$ C)	275
	Energía de colisión (V)	35
	Voltaje del capilar (V)	49
	Modo de escaneo	ITMS – C ESI Z ms [50.00- 2000.00]

## **CAPITULO 3**

### **RESULTADOS**

#### **3.1. Colecta de material herbal**

La planta colectada fue procesada como se indicó en la sección 2.2, obteniéndose 1300 g de hoja seca molida.

#### **3.2. Obtención de extracto primario**

Por medio del procedimiento descrito en la sección 2.3, se obtuvieron 217.7 g de extracto crudo, calculándose un porcentaje de recuperación de 16.8%.

#### **3.3. Ensayo de inhibición de $\alpha$ -glucosidasa**

Se determinó la actividad inhibitoria de la enzima  $\alpha$ -glucosidasa del extracto crudo. Como control positivo se utilizó acarbosa, y el ensayo se realizó como se detalla en la sección 2.4. Los resultados del ensayo se muestran en la tabla 8.



Tabla 11. Ensayo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa sobre el extracto crudo de *S. molle*.

Muestra	Cl <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
Extracto crudo de <i>Schinus molle</i>	171 $\pm$ 5.70
Acarbosa	189 $\pm$ 4.06

### 3.4. Obtención del compuesto o mezcla de compuestos de manera biodirigida

#### 3.4.1. Eliminación de clorofilas

Luego de determinar la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa, el extracto crudo fue sometido a eliminación de clorofilas. Se obtuvieron las fracciones 50% MeOH, 70% MeOH y MeOH. Los porcentajes de recuperación fueron de 34.1%, 16.0% y 49.9% respectivamente. En las figuras 10, 11 y 12 se presentan los cromatogramas de las fracciones obtenidos bajo las condiciones presentadas en la sección 2.9.

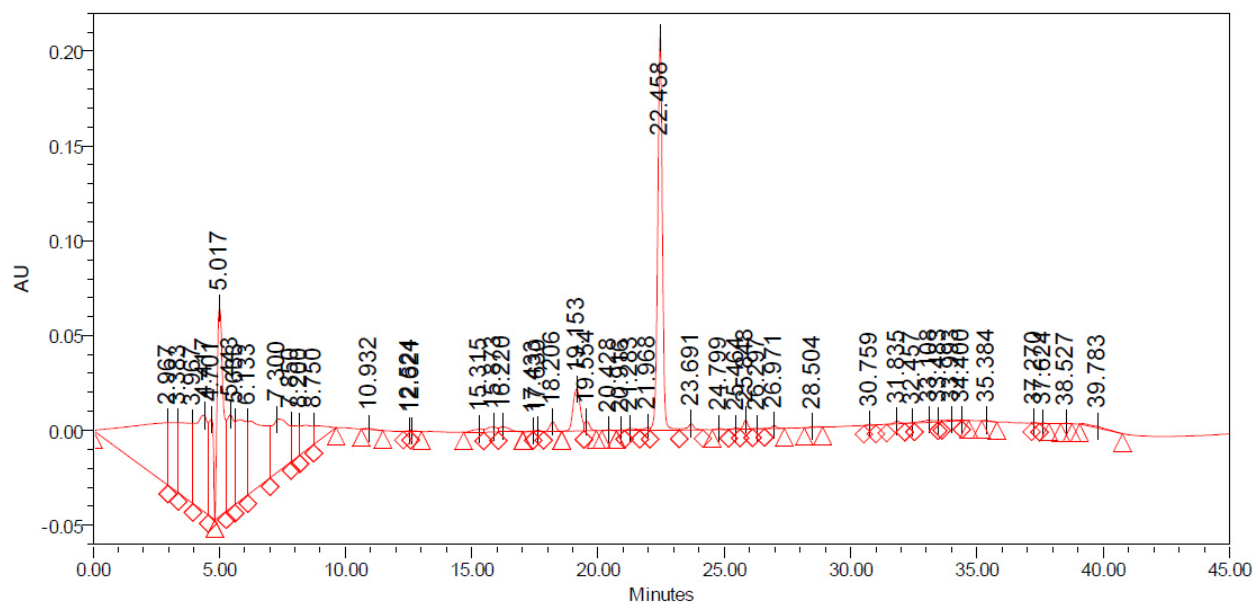


Figura 10. Cromatograma de la Fracción 50% MeOH

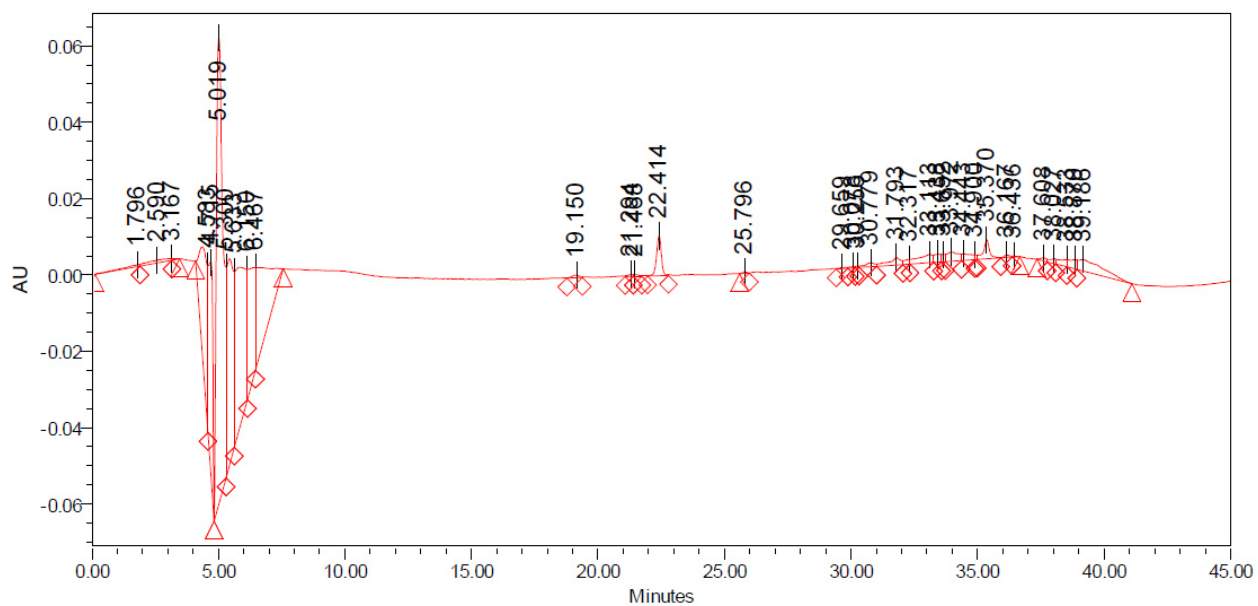


Figura 11. Cromatograma de la Fracción 70% MeOH

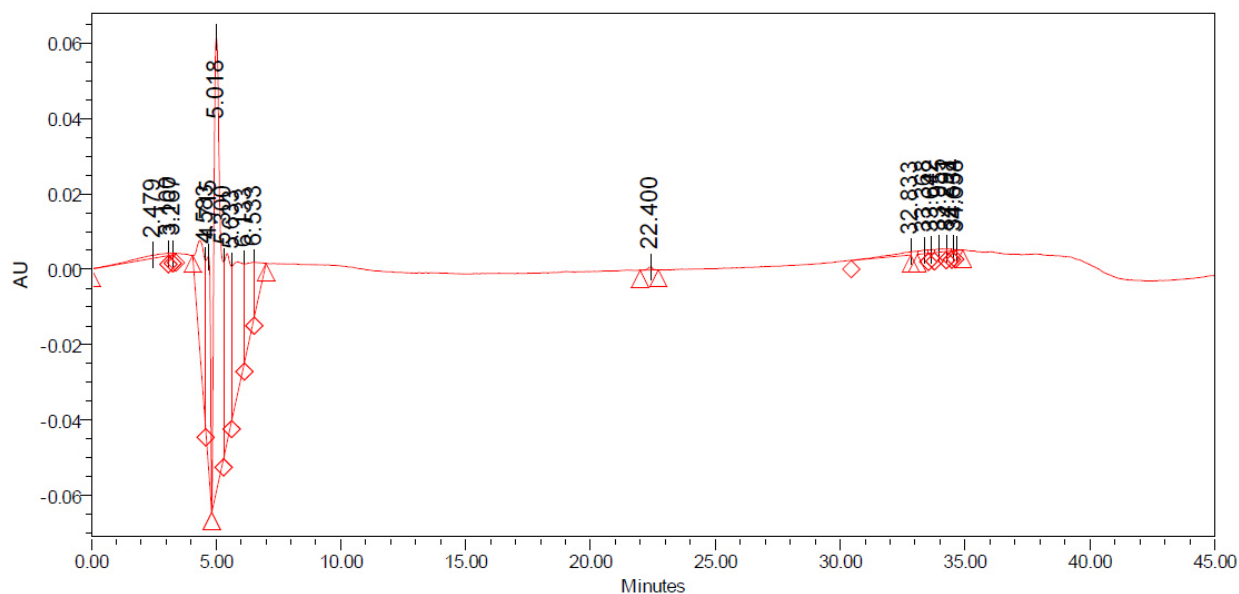


Figura 12. Cromatograma de la Fracción MeOH

Se evaluó su actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa a cada una de las fracciones obtenidas. Los resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 12. Ensayo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa de las fracciones obtenidas de la eliminación de clorofilas.

Fracción	Cl <sub>50</sub> (μg/mL)
Fracción 50% MeOH	183 ± 4.14
Fracción 70% MeOH	> 260
Fracción MeOH	> 260
Acarbosa	189 ± 4.06

### 3.4.2. Cromatografía por permeación en gel

La fracción seleccionada, 50% MeOH, se sometió a un subfraccionamiento por cromatografía por permeación en gel como se describe en la sección 2.7.2. Se obtuvieron cuatro subfracciones llamadas FS1, FS2, FS3 y FS4 de acuerdo al orden en que fueron eluidas de la columna. Los porcentajes de recuperación fueron 40.5%, 34.1%, 22.2% y 2.37% respectivamente. El cromatograma obtenido por cromatografía en capa fina en las condiciones indicadas en la sección 2.8 se muestra en la figura 13. En las figuras 14, 15 y 16 se muestran los cromatogramas obtenidos por HPLC-DAD bajo las condiciones presentadas en la sección 2.9.

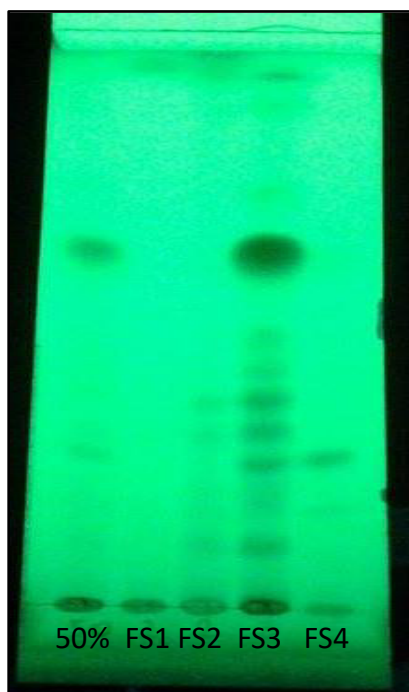


Figura 13. Cromatograma por CCF de las subfracciones obtenidas por cromatografía por permeación en gel de la fracción 50% MeOH.

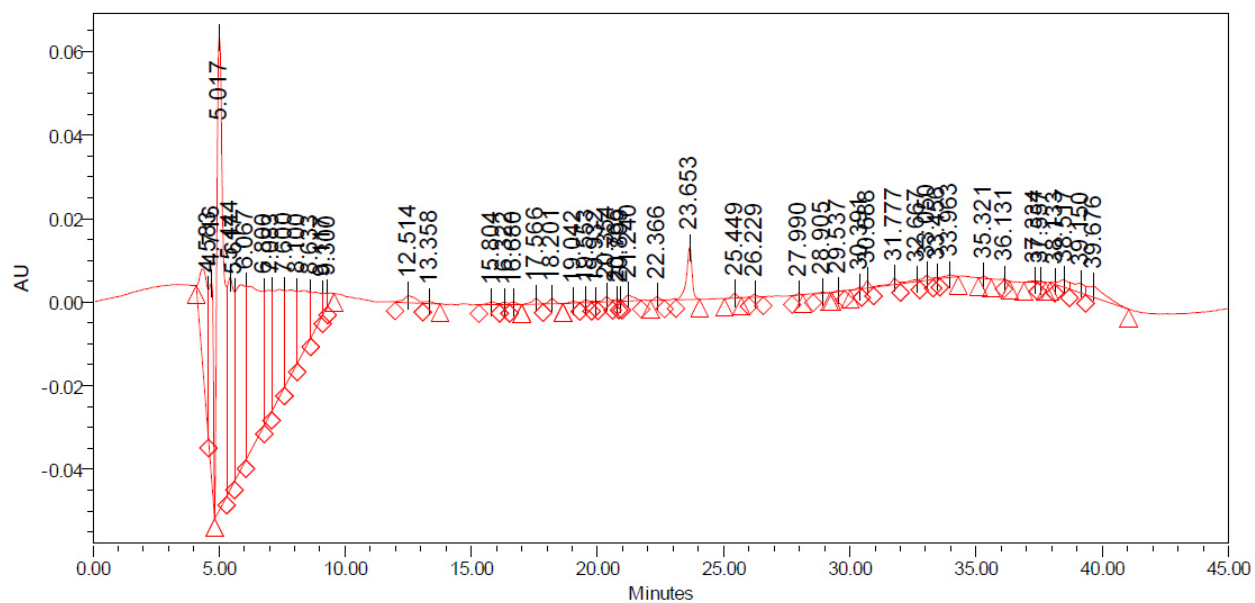


Figura 14. Cromatograma de FS1

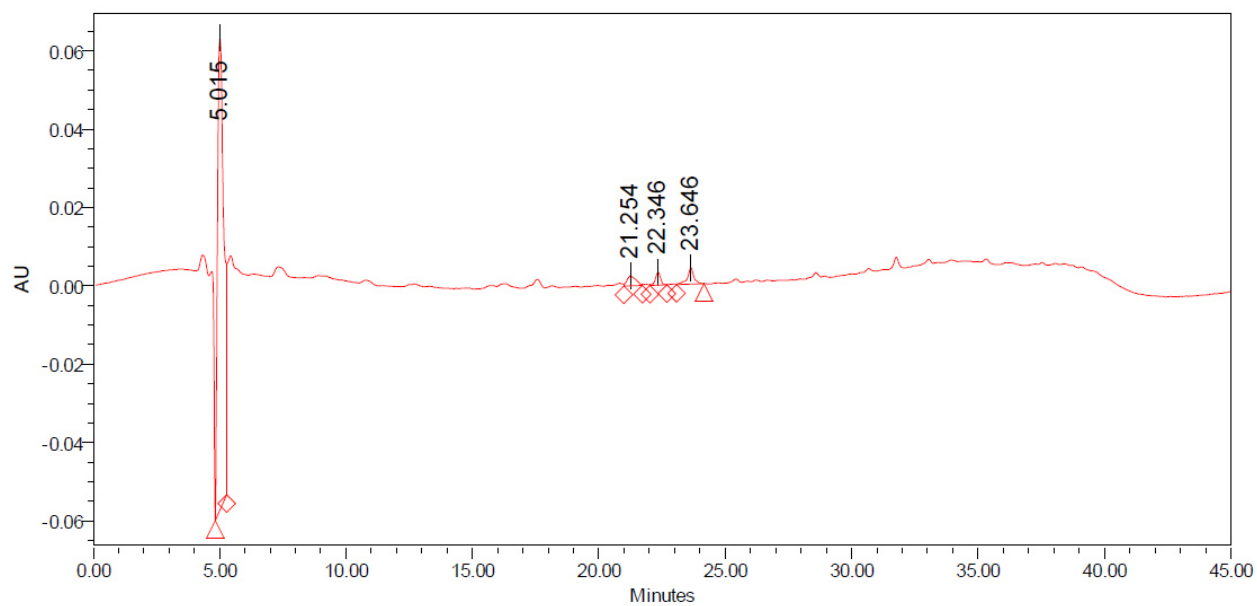


Figura 15. Cromatograma de FS2

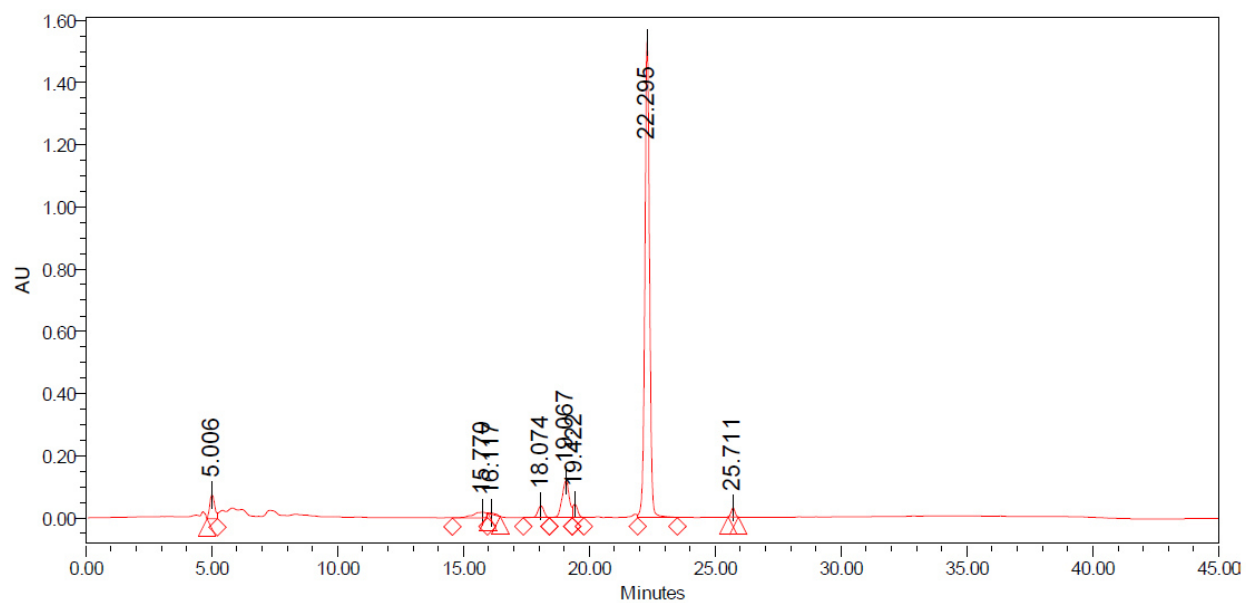


Figura 16. Cromatograma de FS3

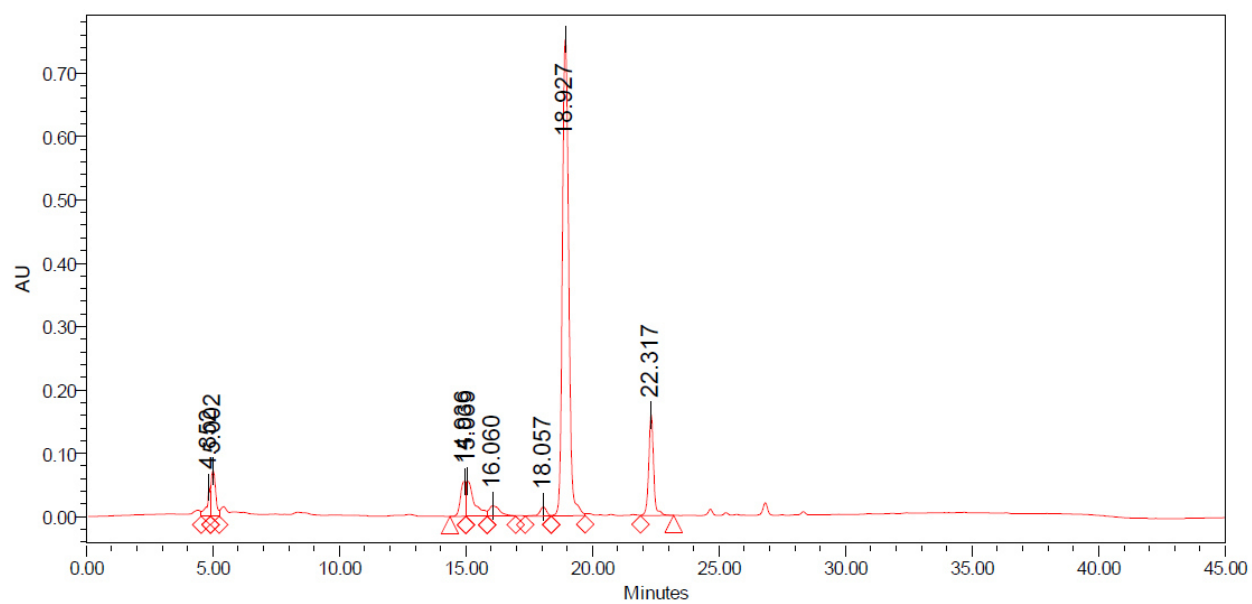


Figura 17. Cromatograma de FS4

A las cuatro subfracciones se les determinó su actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Tabla 13. Ensayo de inhibición de las subfracciones obtenidas por cromatografía por permeación en gel.

Fracción	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ g/mL)
FS1	> 260
FS2	> 260
FS3	164 $\pm$ 2.13
FS4	42.2 $\pm$ 5.18
Acarbosa	189 $\pm$ 4.06

Se calculó un porcentaje de recuperación total de FS4 del 0.11%; es decir, por cada gramo de hoja seca molida, se obtienen 0.11 g de FS4.

#### 3.4.3. Cromatografía de fase inversa

Debido a la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa que presentó FS4, se sometió a un subfraccionamiento por cromatografía de fase inversa como se indica en la sección 2.7.2.2. Se logró aislar un compuesto, con un porcentaje de recuperación de 18.75%. El cromatograma obtenido por cromatografía en capa fina en las condiciones indicadas en la sección 2.8 se muestra en la figura 13. En la figura 19 se muestra el cromatograma obtenido por HPLC-DAD bajo las condiciones presentadas en la sección 2.9.



Figura 18. Cromatograma por CCF de las subfracciones obtenidas por cromatografía de fase inversa de FS4.

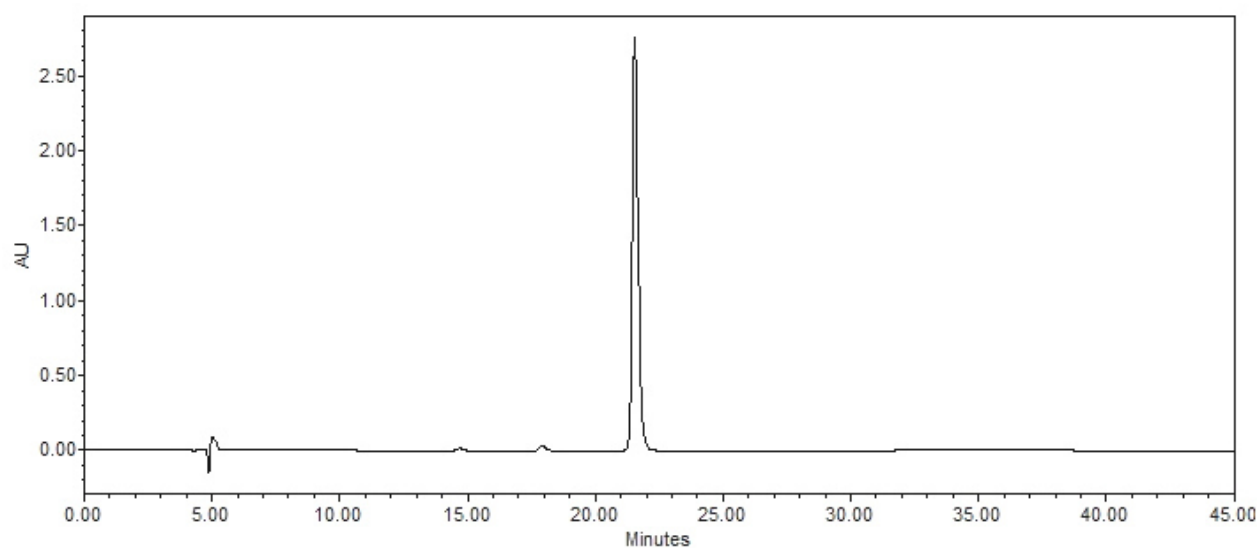


Figura 19. Cromatograma de compuesto aislado de FS4.



A este compuesto aislado se le determinó la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa. Los resultados se muestran en la tabla 14.

Tabla 14. Ensayo de inhibición de las subfracciones obtenidas por cromatografía por permeación en gel.

Fracción	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
Compuesto aislado	<20.0
Acarbosa	189 ± 4.06

### 3.5. Evaluación de Citotoxicidad

Ya que la FS4 fue la fracción con mayor actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa con un mejor porcentaje de recuperación, se le evaluó su citotoxicidad de acuerdo al método presentado en la sección 2.5. Los resultados se muestran en la tabla 11.

Tabla 15. Ensayo citotoxicidad de FS4.

Fracción	Cl <sub>50</sub> (µg/mL)
FS4	> 500
Doxorrubicina	3.56± 0.40

### 3.6. Evaluación de la actividad antihiperglucemiante *in vivo*

Luego de evaluar su citotoxicidad, se probó la actividad antihiperglucemiante de FS4 en un modelo murino del modo que se describe en la sección 2.6. Se probaron dosis de 0.5 y 5.0 mg de FS4 por kilogramo de rata. Los resultados se muestran en la Figura 18. En la Figura 19 se representan los datos del minuto 15.

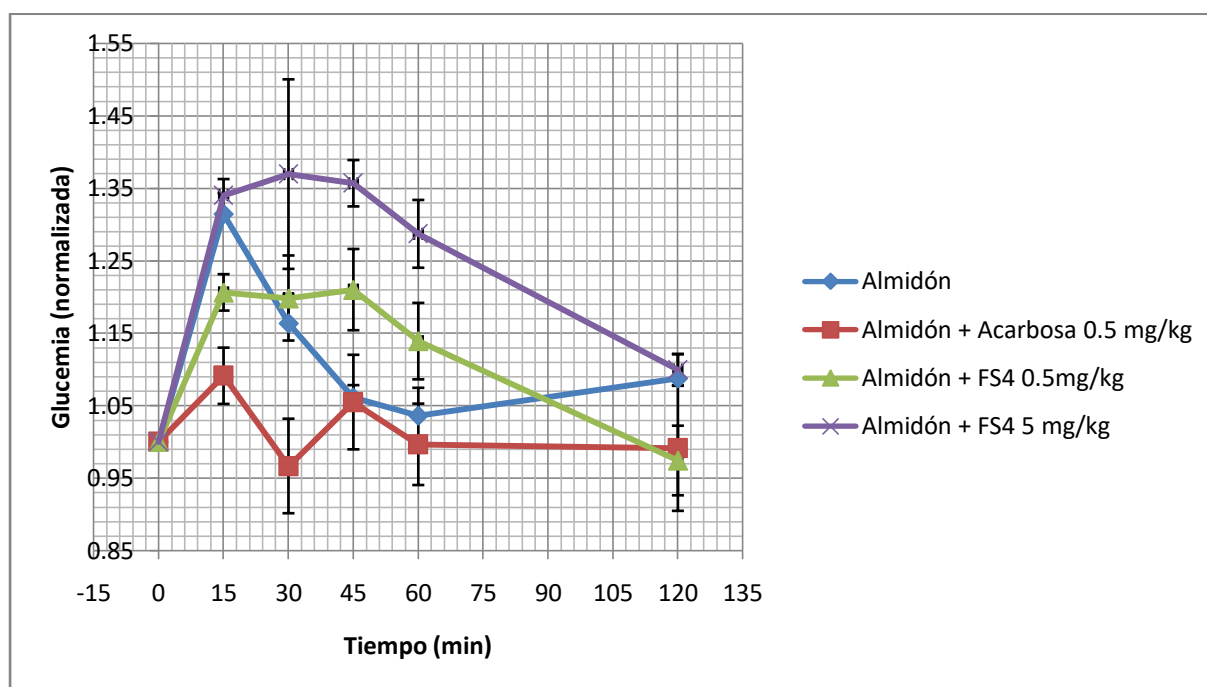


Figura 20. Evaluación de la actividad antihiperglucemiante *in vivo* de FS4. Cinética completa.

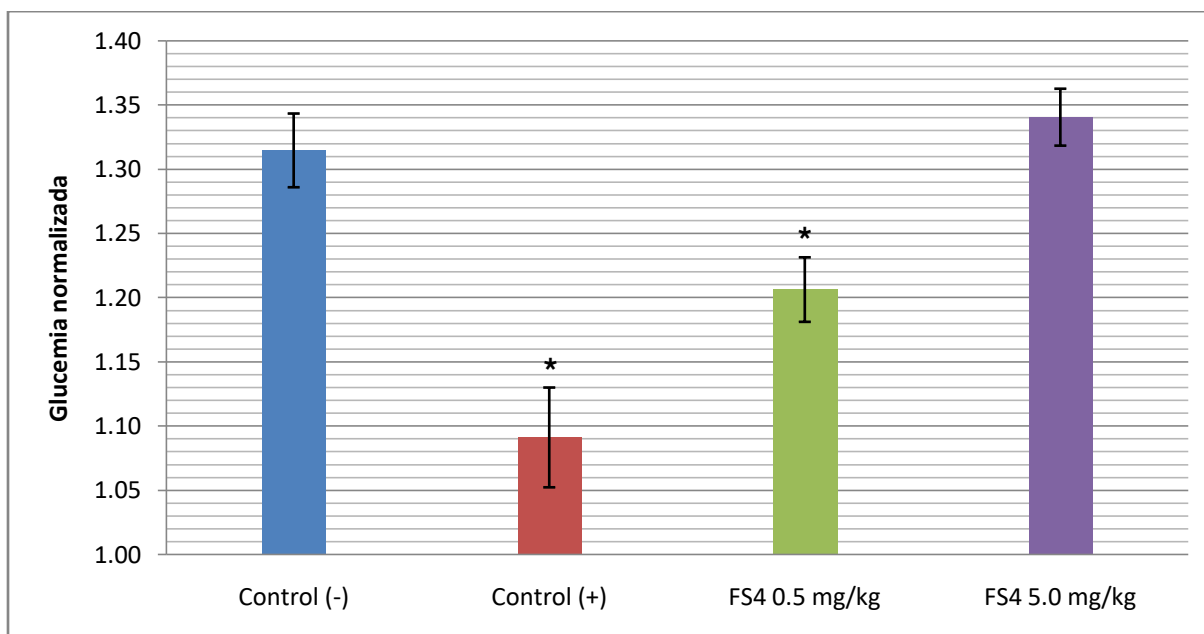


Figura 21. Evaluación de la actividad antihiperglucemiante *in vivo* de FS4. Minuto 15.

\* $p > 0.05$  Respecto a Control Negativo (T de Student).

### 3.7. Caracterización por UHPLC-MS

#### 3.7.1. Análisis por infusión directa en ESI-MS

Se realizó una identificación de los iones moleculares más importantes con base a su abundancia relativa obtenidos de la manera descrita en la sección 2.10.1 para la FS4. En la Figura 20 se presenta el espectro de masas obtenido. En la tabla 11 se presenta la identificación de tres de los iones con mayor abundancia relativa en el escaneo completo de FS4.

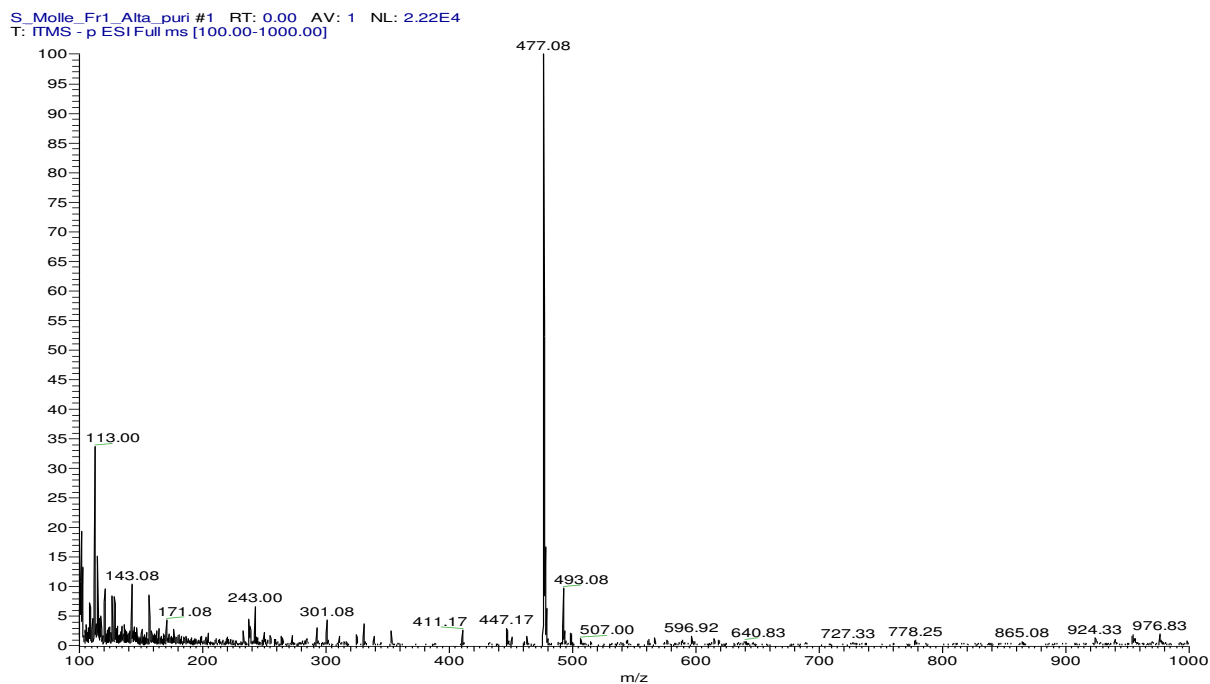


Figura 22. Espectro de masas de FS4.

Tabla 16. Identificación de compuestos de FS4 por ESI-MS.

[M-H] <sup>-</sup>	M <sup>2</sup>	M <sup>3</sup>	Compuesto	Fuente	Antecedente
477	301	179; 151; 257; 193; 121	Miquelianina (Quercetin 3-O-beta-D-glucuronido)	Marzouk, M. (2006) <sup>49</sup>	<i>Schinus molle</i>
493	317	179; 151; 192; 107; 255	Myricetin 3-O-glucuronido	Abu-Reidah, I. (2014) <sup>50</sup>	<i>Rhus coriaria</i> L.
447	301	179; 151; 283; 257; 273; 193	Quercitrina (Quercetin 3-O-L-ramnosido)	Gehrke, I, (2013) <sup>51</sup>	<i>Schinus lentiscifolius</i>

La señal de m/z de 447 fue identificada como Quercitrina, por lo que se analizó un estándar de este compuesto por HPLC-DAD bajo las condiciones presentadas en la sección 2.9. Se compararon los tiempos de retención de las señales más intensas en el cromatograma de FS4 (Figura 17). En la Figura 21 se presenta el cromatograma del estándar de quercitrina.

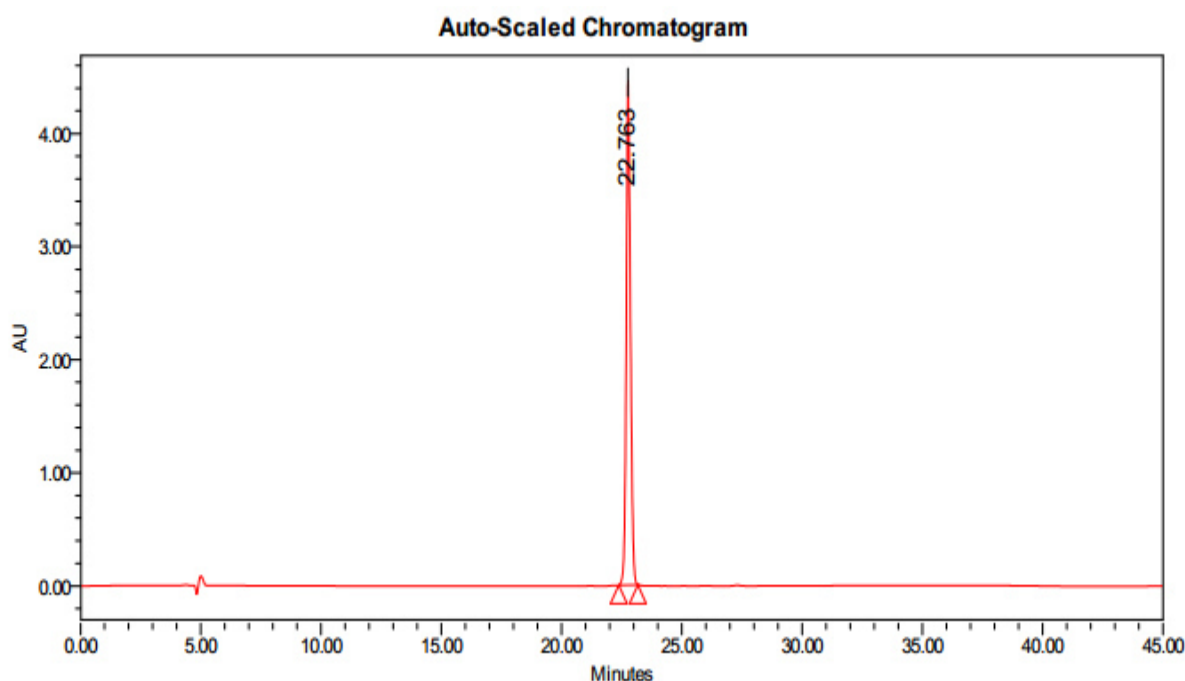


Figura 23. Cromatograma de estándar de quercitrina.

### 3.7.2. Análisis por UHPLC-MS

Se estableció la correlación entre las señales identificadas en el análisis por infusión directa en ESI-MS, y las observadas en el cromatograma de acuerdo a lo descrito en la sección 2.9.2. En la figura 24 se presenta el cromatograma obtenido. En las figuras 25, 26 y 27 se presentan los espectros de masas obtenidos en el modo negativo de los

minutos 2.91, 4.70 y 7.16. En la tabla 16 se presenta la correlación entre los tiempos de retención y los iones identificados en los espectros de masas de cada tiempo, así como la identificación de ellos de acuerdo a lo presentado en la tabla 15.

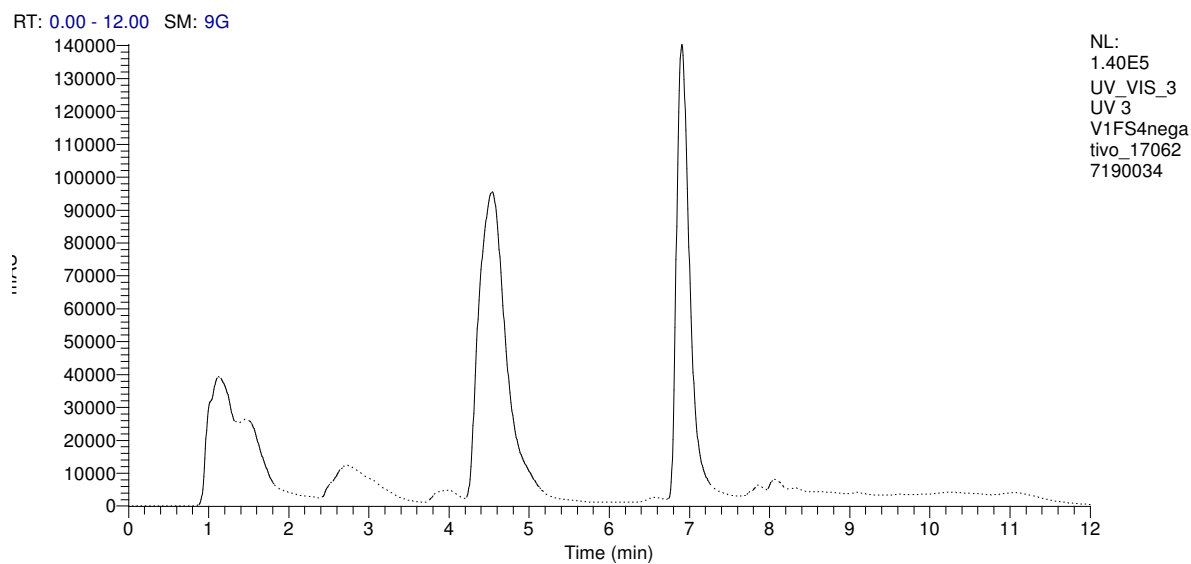


Figura 24. Cromatograma de FS4 obtenido por UHPLC.

V1FS4negativo\_170627190034 #27 RT: 2.91 AV: 1 SB: 2 11.86 , 11.86 NL: 7.76E2  
F: ITMS - c ESI Z ms [50.00-2000.00]

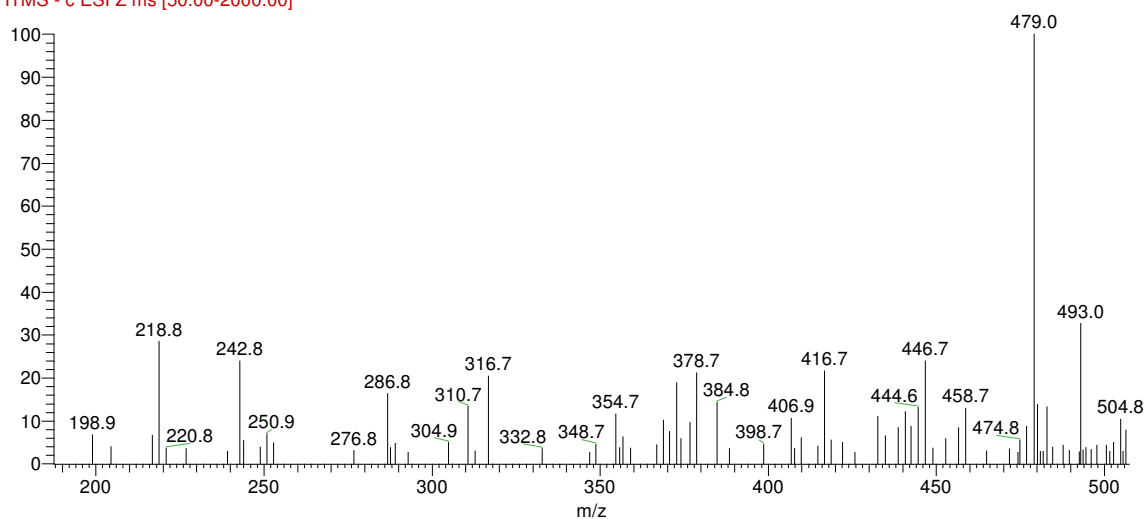


Figura 25. Espectro de masas correspondiente al  $t_R$  de 2.91 minutos del cromatograma de FS4.

V1FS4negativo\_170627190034 #49 RT: 4.70 AV: 1 SB: 2 11.86 , 11.86 NL: 4.00E3  
F: ITMS - c ESI Z ms [50.00-2000.00]

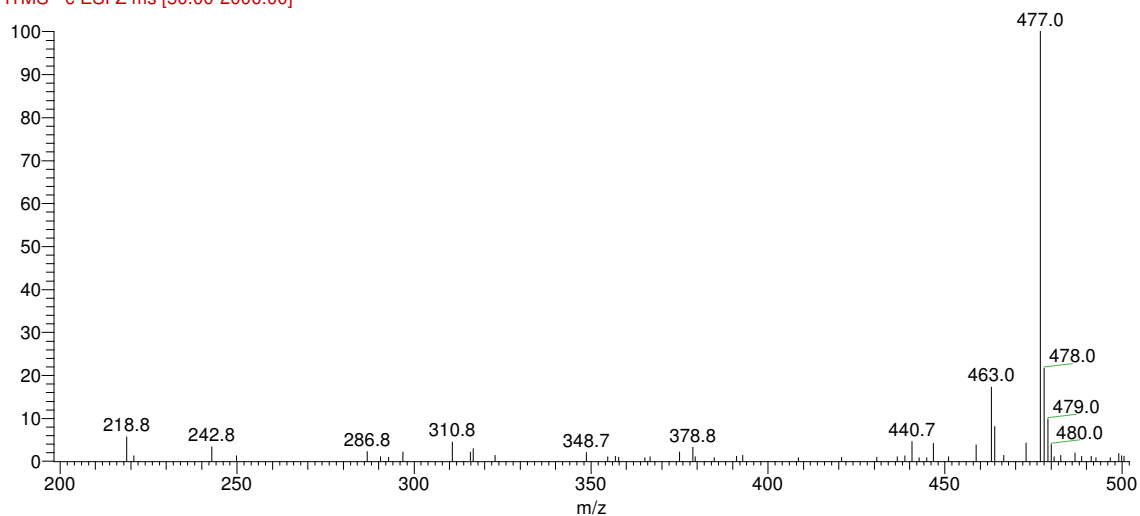


Figura 26. Espectro de masas correspondiente al  $t_R$  de 4.70 minutos del cromatograma de FS4.

V1FS4negativo\_170627190034 #79 RT: 7.16 AV: 1 SB: 2 11.86 , 11.86 NL: 6.05E3  
 F: ITMS - c ESI<sup>+</sup> Z ms [50.00-2000.00]

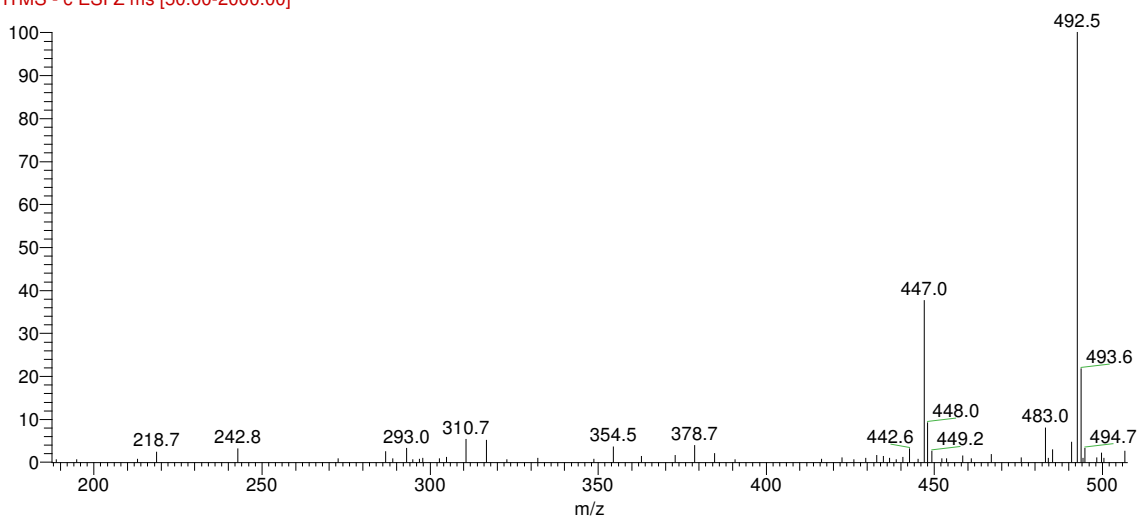


Figura 27. Espectro de masas correspondiente al  $t_R$  de 7.16 minutos del cromatograma de FS4.

Tabla 17. Identificación de compuestos de FS4 por UHPLC-MS.

$t_R$	$[M-H]^-$	Compuesto identificado
2.91	493	Miricetin-3-O-glucuronido
4.70	477	Miquelianina (Quercetin 3-O-beta-D-glucuronido)
7.16	447	Quercitrina (Quercetin 3-O-L-ramnosido)

En las figuras 28, 29 y 30 se presentan las estructuras de los compuestos identificados por UHPLC-MS, de acuerdo a las tablas 15 y 16.



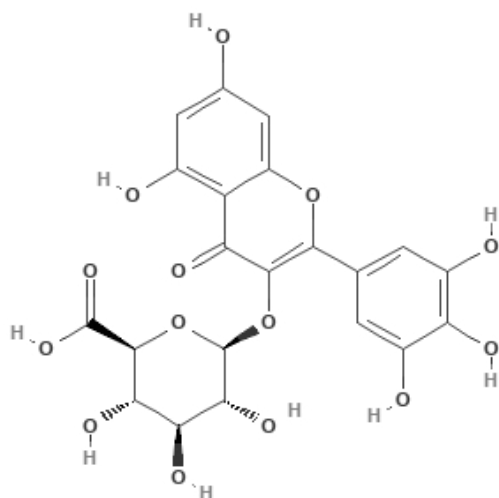


Figura 28. Estructura de Miricetin-3-O-glucuronido.

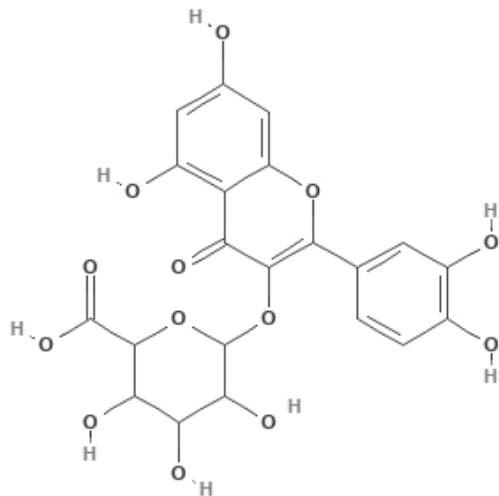


Figura 29. Estructura de Miquelianina.

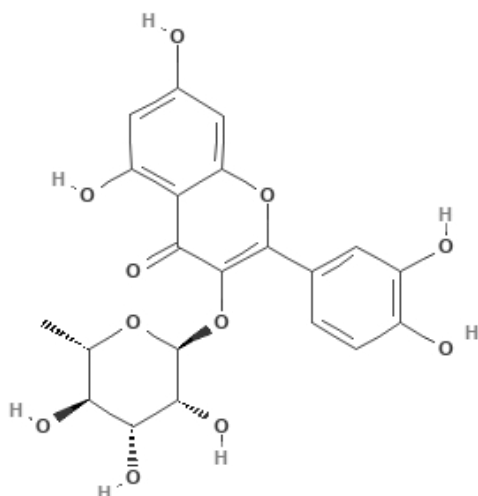


Figura 30. Estructura de Quercitrina.

Se realizó también el análisis del compuesto aislado de FS4 mencionado en la sección 3.4.3 por UHPLC-MS de la manera mostrada en la sección 2.9.2. En la figura 31 se presenta el cromatograma obtenido, y en la figura 32 el espectro de masas correspondiente al  $t_R$  de 4.88 minutos.

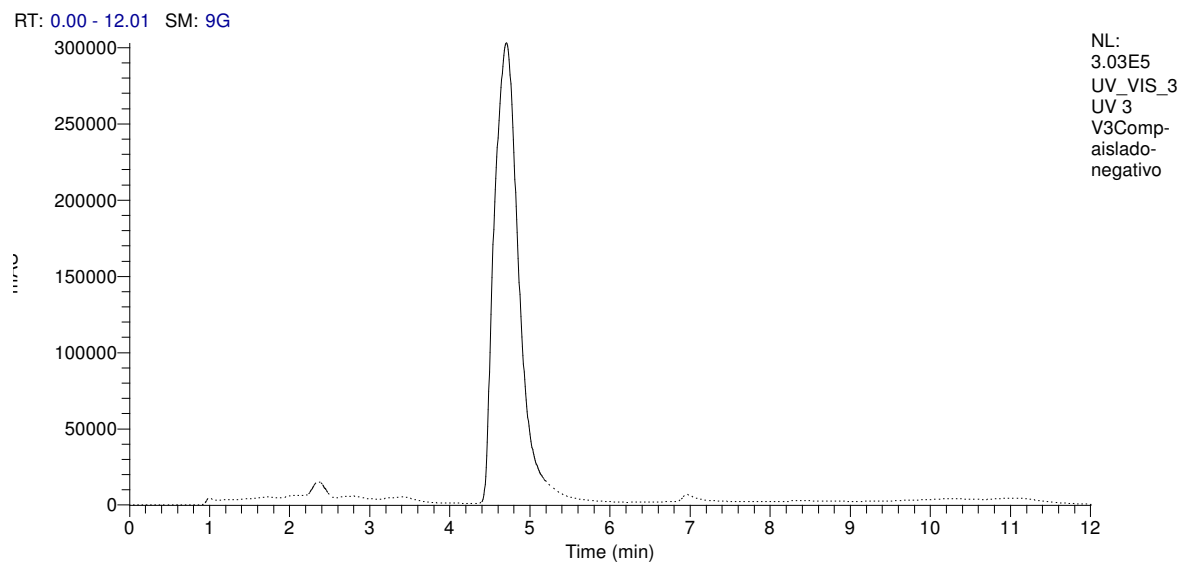


Figura 31. Cromatograma de compuesto aislado de FS4 obtenido por UHPLC.

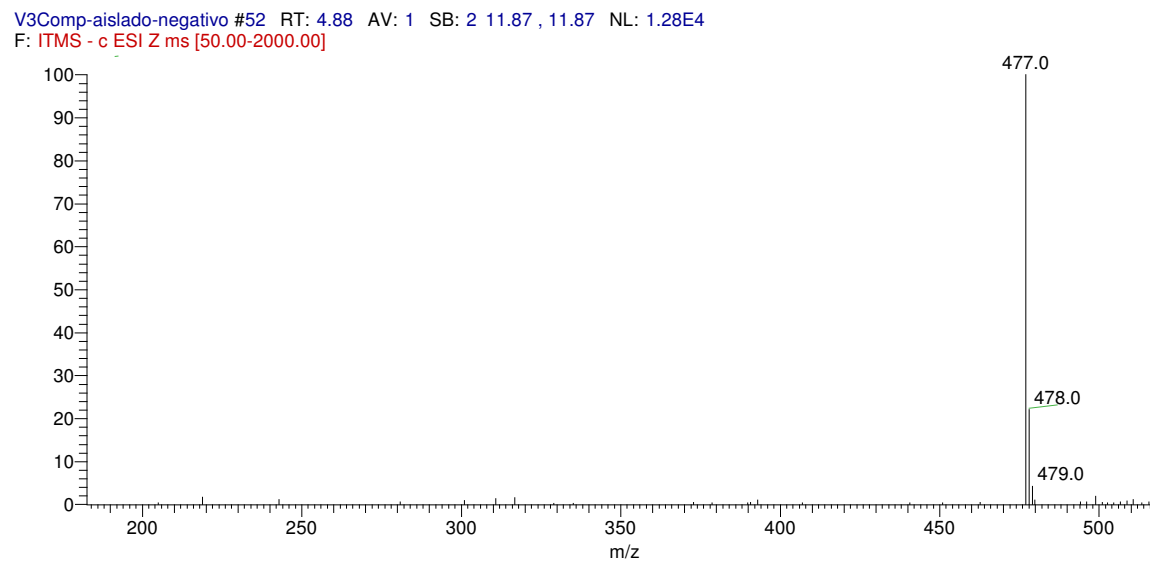


Figura 32. Espectro de masas correspondiente al  $t_R$  de 4.88 minutos del cromatograma del compuesto aislado de FS4.

De acuerdo a los datos presentados se identificó al compuesto aislado como miquelianina, cuya estructura es mostrada en la figura 29.

## CAPITULO 4

### DISCUSIÓN

La diabetes mellitus de tipo 2 es un problema de salud pública importante en México y en el mundo. Los inhibidores de  $\alpha$ -glucosidasa han demostrado ser efectivos en el tratamiento de la T2DM y de condiciones prediabéticas con efectos adversos menos severos en comparación a los otros fármacos antidiabéticos, sin embargo el uso de fármacos en este blanco está limitado a acarbosa, voglibosa y miglitol, por lo que es importante la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos que actúen sobre este blanco con la menor incidencia de efectos adversos posible.

Los productos naturales y sus derivados obtenidos de plantas representan un porcentaje considerable de los fármacos aprobados como nuevas entidades moleculares por la FDA. En México existe una gran variedad de plantas medicinales, y a una gran parte de ellas se les atribuyen propiedades antidiabéticas, por lo que la búsqueda de nuevas moléculas que inhiban a la enzima  $\alpha$ -glucosidasa a partir de dichas plantas resulta importante.

Se seleccionó trabajar con *Schinus molle* debido a que crece abundantemente en el noreste de México, y a que existen reportes de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa de extractos obtenidos de esta planta. Así mismo en un estudio previo realizado en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. se

demonstró la actividad de dos extractos obtenidos de la hoja, de un espécimen colectado en diciembre de 2013 en el municipio de Arteaga, Coahuila por lo que resultó de suma importancia caracterizar a el o los compuestos responsables de dicha actividad.

La colecta fue realizada en julio de 2016. Para verificar que efectivamente el extracto obtenido de la colecta de esa temporada era activo, se realizó el ensayo de inhibición de  $\alpha$ -glucosidasa. Luego de comprobar que el extracto metanólico crudo obtenido de la hoja seca presentaba actividad como se puede observar en la Tabla 11, se procesó toda la hoja seca y molida, y se prosiguió a la eliminación de clorofilas. Se obtuvieron tres fracciones, de las cuales la obtenida con MeOH al 50% fue la que mostró mejor actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa mostró.

Se consideraron distintas técnicas de separación cromatográfica para el subfraccionamiento de la Fr. 50% MeOH, muchas de las cuales utilizaban sílica gel como fase estacionaria. Debido a que se sospechaba que los metabolitos activos eran de naturaleza polar se descartó el uso de sílica gel para evitar pérdidas mayores, y por protocolos internos del laboratorio, el uso de una fase estacionaria de octadecilsilano fue descartado hasta una etapa posterior de limpieza de la muestra. Se optó entonces por utilizar una fase estacionaria inerte, el gel dextrano Sephadex LH-20 en MeOH. Se obtuvieron cuatro subfracciones, dos de las cuales mostraron actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa mejor que la de acarbosa, siendo la denominada FS4 la mejor de las dos. En un fraccionamiento de flavonolglicósidos a partir de *Schinus molle* realizado por Marzouk y colaboradores en 2006,<sup>50</sup> se utilizó Sephadex LH-20 como fase estacionaria, pero utilizando una variedad mayor de solventes como fases móviles como n-butanol,

isopropanol, etanol y hexano en distintas proporciones, se logró obtener al menos ocho compuestos puros.

En el análisis por HPLC-DAD de las fracciones activas, FS3 y FS4, se pudo observar que había dos señales de tiempos de retención similares en ambos cromatogramas. En el cromatograma de FS3 la señal de  $t_R$  de 19.067 min se presentaba en menor proporción con respecto a la señal del  $t_R$  de 22.29 min; en el cromatograma de FS4 sucedía lo contrario, la señal de  $t_R$  de 18.927 min se presentaba en mayor proporción respecto a la de  $t_R$  de 22.317 min. Esto puede significar que el compuesto presente de la señal del minuto 18.927 fuese el responsable de la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa de FS4. Incluso de la que se llegó a presentar en FS3.

Ya que FS4 presentó una actividad casi 4 veces mejor que acarbosa, se consideró probar su actividad antihiper glucemiante en el modelo *in vivo* propuesto. Para justificar su uso en animales se realizó el ensayo de citotoxicidad sobre células Verobasados en lo propuesto por Mossman. El ensayo de citotoxicidad mostró que la fracción FS4 no es citotóxica ( $CC_{50} > 500 \mu\text{g/mL}$ ) justificándose así su uso en el modelo animal.

Para el modelo animal se propusieron dos dosis, una igual a la del control positivo (acarbosa a 0.5 mg/kg) y una mayor (5 mg/kg) ya que al tratarse de un compuesto puro, se debía ampliar la ventana para comprobar que existiera actividad antihiper glucemiante de FS4. En la curva glucemia *versus* tiempo (Figura 20) se pudo observar que FS4 a una dosis de 0.5 mg/kg reducía la hiper glucemia en el minuto 15. Esto se puede ver con mayor claridad calculando el porcentaje de aumento de glucemia al minuto 15, por comparación de los resultados obtenidos entre el control negativo y

FS4 a 0.5 mg/kg de acuerdo a la prueba T de Student se pudo comprobar que hay diferencia significativa entre ellos. Sin embargo, no se pudo observar una reducción de glucemia por medio de FS4 a dosis de 5.0 mg/kg; de acuerdo a la bibliografía<sup>52</sup> cuando un fármaco no es administrado de manera aislada, se pueden presentar fenómenos de inhibición o inducción enzimática; este último se refiere al aumento del metabolismo de un fármaco gracias a la inducción de un segundo componente en la formulación lo que lleva a una reducción de la actividad farmacológica en ciertos casos. Esto podría explicar la disminución de la actividad a una dosis mayor de FS4, pero debido a que no se conoce con exactitud la composición de esta fracción, los mecanismos que pudiesen estar involucrados en la disminución de su actividad no son claros.

Respecto de la composición química de esta fracción, primero se hizo un análisis por espectrometría de masas con infusión directa, se identificaron tres moléculas principales: miquelianina, quercitrina y miricetin-3-O-glucuronido. Estas moléculas fueron reportadas en plantas con relación filogenética con *Schinus molle*, ya sea en familia, género o especie. La única reportada en *Schinus molle* es miquelianina en 2006 por Marzouk y colaboradores. Además, el  $t_R$  de un estándar de quercitrina fue de 22.763 min coincidente con el pico de  $t_R$  22.317 min en el cromatograma de FS4.

Para asegurar la identificación realizada en la infusión directa en MS, posteriormente se realizó el análisis utilizando UHPLC-MS. En el minuto 2.17 se ubicaron al menos 2 iones moleculares, uno correspondía a miricetin-3-O-glucuronido, a 4.70 min se observó solo una señal que se atribuyó a miquelianina, y en 7.16 min aparecían también dos señales, una de las cuales correspondía a quercitrina.



La obtención de FS4 significó una limpieza de la muestra por lo que se procedió a realizar una separación cromatográfica utilizando octadecilsilano como fase estacionaria. Con esta técnica se logró aislar un componente que aparecía puro tanto en CCF como en HPLC, donde se observaba una señal en un  $t_R$  de 21.538 min. El compuesto aislado de FS4 presentó una  $CI_{50} < 20 \mu\text{g/mL}$  sobre  $\alpha$ -glucosidasa, dado que la curva usada no cubría rangos menores de concentración no se pudo establecer con exactitud la  $CI_{50}$ .

De acuerdo al análisis realizado por UHPLC-MS, este compuesto fue identificado como miquelianina.

En un estudio realizado en 2017 por Kashchenko<sup>53</sup> y colaboradores, se probó la actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa de un extracto etanólico de *Comarum palustre*. Este extracto contenía como uno de los compuestos mayoritarios a la miquelianina. Con los resultados obtenidos en este trabajo podemos pensar que es ese compuesto el que da la mayor actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa a FS4.

Es importante mencionar que la identificación del compuesto aislado por UHPLC-MS como miquelianina no es definitiva. Con esta técnica se pudo determinar que el compuesto tenía base de quercetina, y que probablemente estaba unido a un ácido urónico (glucurónico o galacturónico), pero la posición de quercitina a la que estaba unido no se podría determinar por espectrometría de masas; para esto es necesario realizar un análisis por Resonancia Magnética Nuclear tanto de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en una y dos dimensiones. También es necesario determinar si el ácido urónico unido es ácido

glucurónico, o ácido galacturónico, que difieren sólo en la orientación del C-4, por ejemplo con Cristalografía de Rayos X.

Debido a los bajos porcentajes de recuperación del compuesto aislado identificado como miquelianina, no se probó su citotoxicidad *in vitro* ni su actividad antihiper glucemiante en el modelo *in vivo*.

## CAPITULO 5

### CONCLUSIONES

Se obtuvo una fracción del extracto metanólico de hoja de *Schinus molle* con actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro* mejor que la del control positivo.

De esta fracción se aisló e identificó el componente mayoritario como miquelianina que resultó con una elevada actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa *in vitro*.

La FS4 presentó actividad en un modelo *in vivo* de reducción de la hiperglucemia postprandial en ratas macho normoglucémicas.

## CAPITULO 6

### PERSPECTIVAS

Aislar los otros compuestos presentes en mayor proporción en FS4 y evaluarlos por su actividad inhibitoria de  $\alpha$ -glucosidasa.

Asegurar la identidad de los compuestos presentes en mayor proporción en FS4 por medio de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN.

Evaluar a FS4 en el modelo *in vivo* a dosis más bajas que 0.5 mg/kg, así como en el rango 0.5-5 mg/kg, para determinar la dosis de mayor efectividad en la reducción de la hiperglucemia postprandial.

Evaluar el compuesto aislado en el modelo *in vivo* de reducción de hiperglucemia postprandial.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus (1999). World Health Organization. Consultado el 1 de agosto de 2016.  
  
[[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66040/1/WHO\\_NCD\\_NCS\\_99.2.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/66040/1/WHO_NCD_NCS_99.2.pdf)]
2. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas. Seventh Edition. 2015: 11-129.
3. Distribución de casos nuevos de enfermedad por mes. Estados Unidos Mexicanos 2015. Anuario de Morbilidad 1984-2015. Morbilidad Nacional. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. Consultado el 11 de agosto de 2016.  
  
[[http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/morbilidad/enfermedad/distribucion\\_casos\\_nuevos\\_enfermedad\\_mes.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/morbilidad/enfermedad/distribucion_casos_nuevos_enfermedad_mes.pdf)]
4. "Veinte principales causas de enfermedad Nacional, por mes de notificación. Estados Unidos Mexicanos 2015." Anuario de Morbilidad 1984-2015. Morbilidad Nacional. Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. Consultado el 11 de agosto de 2016.  
  
[[http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/morbilidad/nacional/veinte\\_principales\\_causas\\_enfermedad\\_nacional\\_mes.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/morbilidad/nacional/veinte_principales_causas_enfermedad_nacional_mes.pdf)]
5. Boletín Epidemiológico semanal. Semana N° 32 (2017). Dirección General de Epidemiología. Secretaría de Salud. Consultado el 21 de agosto de 2017.

[<https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/250310/sem32.pdf>]

6. Kaul, K., Tarr, J., Ahmad, S., Kohner, E. & Chiber R. (2013). Introduction to Diabetes Mellitus. En Diabetes (1-10). New York: Springer Science + Business Media, LCC.
7. Harvey, R. & Ferrier, D., (2011). Bioquímica 5° Edición. Barcelona: Lippincott's Williams & Willins. Pp. 83-88, 307-318, 337-346
8. Bases Moleculares de las acciones de la Insulina. Facultad de Medicina, UNAM. Consultado el 12 de agosto de 2016.

[[http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2008/01/f\\_Articulo2.pdf](http://www.facmed.unam.mx/publicaciones/ampb/numeros/2008/01/f_Articulo2.pdf)]  
]

9. Imam, K., (2013). Management and Treatment of Diabetes Mellitus. En Diabetes (356-376). New York: Springer Science + Business Media.
10. Harper, W., Clement, M., Goldenberg, R., Hanna, A., Main, A., Retnakaran, R., Sherifali, D., Woo, V. & Yale, J., (2013). Pharmacologic Management of Type 2 Diabetes. Canadian Journal of Diabetes, 37, 561-568.
11. Toft, M., Madsbad, S. & Holst J., (2011, abril 26). Determinants of the Effectiveness of Glucagon-Like Peptide-1 in Type 2 Diabetes. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 86, 3853-3860.
12. Mata, R., Cristians, S., Escandón, S., Juárez, K. & Rivero, I., (2013, febrero 11). Mexican Antidiabetic Herbs: Valuable Sources of Inhibitors of alpha-glucosidases. Journal of Natural Products, 76, 468-483.

13. Zhang,H., Wang, G., Beta, T. & Dong, J., (2015). Inhibitory Properties of Aqueous Ethanol Extracts of Propolis on Alpha-Glucosidase. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2015, 1-7.
14. Oh, J., Jo, S., Kim, J., Ha, K., Lee, J., Choi, H., Yu, S., Kwon, Y. & Kim, Y., (2015, abril 21). Selected Tea and Tea Pomace Extracts Inhibit Intestinal alpha-glucosidase activity in vitro and postprandial hyperglycemia in vivo. International Journal of Molecular Sciencies, 16, 8811-8825.
15. Biblioteca digital de la Medicina Tradicional. UNAM. Consultado el 13 de agosto de 2016.  
  
[<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/atlas.php>]
16. Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2014-2023. World Health Organization. Consultado el 18 de agosto de 2016.
17. Jordan, S., Cunningham, D. & Marles, R., (2009, december 16). Assessment of herbal medicinal products: Challenges, and opportunities to increase the knowledge base for safety assessment. Toxicology and Applied Pharmacology, 243, 198-216.
18. Patridge, E., Gareiss, P., Kinch, M. & Hoyer, D., (2015, enero 14) An analysis of FDA-approved drugs: natural products and their derivatives. Drug Discovery Today, 21, 204-207.

19. Newman, D. & Cragg, G., (2012, febrero 08). Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. *Journal of Natural Products*, 75, 311-335.
20. Covarruvias, A. & Guevara, U., (2009, marzo 31). Evaluación del consumo de medicina herbal en el enfermo con dolor: Un estudio piloto. *Revistamexicana de Anestesiología*, 32, 156-162.
21. Popović Z, Matić R, Bojović S, Stefanović M, Vidaković V., (2016) Ethnobotany and herbal medicine in modern complementary and alternative medicine: An overview of publications in the field of I&C medicine 2001-2013. *J Ethnopharmacology*, 181:182-192.  
  
[[http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098\\_spa.pdf?ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95008/1/9789243506098_spa.pdf?ua=1)]
22. Li, G., Kam, A., Wong, K., Zhou, X., Omar, E., Alqahtani, A., Li, K., Razmovski-Naumovski, V. & Chan, K., (2013). Herbal medicines for the management of diabetes. En *Diabetes*(396-409). New York: Springer Science + Business Media.
23. Lee, W., Kao, S., Liu, I. & Cheng, J., (2007). Ginsenoside Rh2 is one of the active principles of *Panax ginseng* root to improve insulin sensitivity in fructose-rich chow-fed rats. *HormMetab Res*. 39: 347-354.
24. Nhiem N., Kiem P., Minh C., Ban, N., Cuong, N., Tung, N., Hale, M., Tai, B., Quang, T., Ngoc, T., Kwon, Y., Jang, H. & Kim, Y., (2010). Alpha-Glucosidase inhibition properties of cucurbitane-type triterpene glycosides from the fruits of *Momordica charantia*. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 58: 720-724.



25. Uebanso, T., Arai, H., Taketani, Y., Fukaya, M., Yamamoto, H., Mizuno, A., Uryu, K., Hada, T. & Takeda, E., (2007) Extracts of *Momordicacharantia* suppress postprandial hyperglycemia in rats. J NutrScieVitaminol (Tokyo), 53: 482-488.
26. Shetty, A., Kumar, G. & Salimath, P., (2005). Bittwe gourd (*Momordicacharantia*) modulates activities of intestinal and renal disaccharidases in streptozotocin-induced diabetic rats. MolNutr Food Res, 49: 791-796.
27. Hansawasdi, C. & Kawabata, J.. (2006) Alpha-glucosidase inhibitory effect of mulberry (*Morus alba*) leaves on Caco-2. Fitoterapia, 77: 568-573.
28. Miyahara, C., Maki, M., Satoh, S., Sakai, A. & Mizusaki, S., (2004). Inhibitory effects of mulberry leaf extract on postprandial hyperglycemia in normal rats. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 50: 161-164.
29. Kwon, H., Chung, J., Kim, J. & Kwon, O., (2011). Comparison of l-deoxynojirimycin and aqueous mulberry leaf extract with emphasis on postprandial hypoglycemic effects: *in vivo* and *in vitro* studies. J Agric Food Chem, 59: 3014-3019
30. Kim, S. & Nho, H., (2004). Isolation and characterization of alpha-glucosidase inhibitor from the fungus *Ganoderma lucidum*. J Microbiol, 42: 223-227.
31. Moorthy, R., Prabhu, K. & Murthy, P., (2010). Anti-hyperglycemic compound (GII) from fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* Linn.) seeds, its purification and effect in diabetes mellitus. Indian J Exp Biol, 48: 1111-1118.

32. Ponnusamy, S., Rvindran, R., Zinjarde, S., Bhargava, S. & Ravi, A., (2011). Evaluation of traditional Indian antidiabetic medicinal plants for human pancreatic amylase inhibitory effect in vitro. *Evid Based Complement Alternat Med.*, 2011.
33. Du, Z., Liu, R., Shao, W., Mao, X., Ma, L., Gu, L., Huang, Z. & Chan, A., (2006). Alpha-glucosidase inhibition of natural curcuminoids and curcumin analogs. *Eur J Med Chem*, 41: 213-218.
34. Li, D., Qian, Z. & Li, S., (2010). Inhibition of three selected beverage extracts on alpha-glucosidase and rapid identification of their active compounds using HPLC-DAD-MS/MS and biochemical detection. *J Agric Food Chem*, 58: 6608-6613.
35. Abeywickrama, K., Ratnasooriya, W. & Amarakoon, A.,(2011). Oral hypoglycaemic, antihyperglycaemic and antidiabetic activities of Sri Lankan Broken Orange Pekoe Fannings (BOPI') grade black tea (*Camellia sinensis* L.) in rats. *J Ethnopharmacol*, 135: 278-286.
36. Lim, T., (2011). *Schinus molle*. En *Edible Medicinal and Non-Medicinal Plants*(153-159). New York: Springer Science+Business Media B.V.
37. Peruvian Pepper Tree, *Schinus molle*. UFEI.Cal Poly. Consultada el 13 de agosto del 2016.  
  
[<https://selectree.calpoly.edu/tree-detail/schinus-molle>]
38. Ono, M., Yamashita, M., Mori, K., Masouka, C., Eto, M., Kinjo, J., Ikeda, T., Yoshimitsu, H. & Nohara, T., (2008, junio 24). Sesquiterpenoids, triterpenoids and

flavonoids from the fruits of *Schinus molle*. Food Science Technologies, 14, 499-508.

39. Guerra, L. Álvarez, R., Salazar, R., Torres, A., Rivas, V., Waksman, N., Gonzalez, G. & Pérez, L., (2013, enero 08). Chemical compositions and antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils from *Magnolia grandiflora*, *Chrysactiniamexicana*, and *Schinusmolle* found in northeast Mexico. Natural Product Communications, 8, 135-138.
40. López, A., Castro, S., Andina, M., Munguía, B., Llabot, J., Elder, H., Dellacasa, E., Palma, S. & Dominguez, L., (2013, diciembre, 23). Insecticidal activity of microencapsulated *Schinus molle* essential oil. Industrial Crops and Products, 53, 209-216.
41. Ruffa, M., Ferraro, G., Wagner, M., Calcagno, M., Campos, R. & Cavallaro, L., (2001, diciembre 14). Cytotoxic effect of Argentine medicinal plant extracts on human hepatocellular carcinoma cell line. Journal of Ethnopharmacology, 79, 335-339.
42. Zeng, Y., Recio, M., Mañez, S., Giner, R., Cerda, M. & Ríos, J., (2003). Isolation of two triterpenoids and a biflavanone with anti-Inflammatory activity from *Schinusmolle* fruits. Planta Medica, 69, 893-898.
43. Machado, D., Bettio, L., Cunha, M., Santos, A., Pizzolatti, M., Brighente, I. & Rodrigues, A., (2003). Antidepressant-like effect of rutin isolated from the ethanolic extract from *Schinusmolle* L. in mice: evidence for the involvement of the

serotonergic and noradrenergic systems. *European Journal of Pharmacology*, 587, 163-168.

44. Bello, R., Beltran, B., Moreno, L., Calatayud, S., Primo, E. & Esplugues, J., (1998). In vitro pharmacological evaluation of the dichloromethanol extract from *Schinus molle* L. *Phytotherapy Research*, 12, 523-525.
45. Olafsson, K., Jaworszewski, J., Wagner, U. & Nyman, U., (1996, diciembre 21). Isolation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibiting triterpenes from *Schinus molle*. *Planta Medica*, 63, 352-355.
46. Huerta, V., Mihalik, K., Maitin, V., Crixell, S. & Vatter, D., (2007, septiembre). Effect of Central/South American medicinal plants on energy harvesting ability of the mammalian GI tract. *Journal of Medicinal plants Research*, 1, 038-049.
47. Galvez, L., Kwon, Y., Apostolidis, E. & Shetty, K., (2010, febrero 25). Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. *Bioresource Technology*, 101, 4676-4689.
48. Mora, G., Negrete, E., Acevedo, J., Santaolalla, J., Salazar, R. & Waksman, N. Actividad hipoglucémica de extractos y fracciones de Pirul (*Schinus molle*). En N. Waksman (Presidencia) 10<sup>a</sup> Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales, AMIPRONAT. Congreso llevado a cabo en Yucatan, México 2014.

49. Marzouk, M., Moharram, F., Haggag, E., Ibrahim, M. & Badary, O., (2006). Antioxidant flavonol glycosides from *Schinus molle*. *Phytotherapy Research*. 20: 200-205.
50. Abu-Reidah, I.m Ali-Shtayeh, M., Jamous, R., Arráez-Román, D. & Segura-Carretero, A., (2014). HPLC-DAD-ESI-MS/MS screening of bioactive components from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. *Food Chemistry*. 166: 179-191.
51. Gehrke, I., Neto, A., Pedroso, M., Mostardeiro, C., Da Cruz, I., Silva, U., Ilha, V., Dalcol, I. & Morel, A., (2013). Antimicrobial activity of *Schinus lentiscifolius* (Anacardiaceae). *Journal of Ethnopharmacology*. 148-2:486-491.
52. Stockley I. Consideraciones generales y revisión de algunos mecanismos básicos de interacción. Pharma ed. *Interacciones farmacológicas*. 1ª ed. 2004. p. 1-13
53. Kashchenko, N., Chirikova, N. & Olennikov, D., (2017) Agrimoniin, an Active Ellagitannin from *Comarum palustre* Herb with Anti- $\alpha$ -glucosidase and Antidiabetic Potential in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *Molecules*. 22, 73.

## **RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO**

Gualberto Mora Castillo

Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias con Orientación en Química  
Biomédica.

Campo de Estudio: Ciencias de la Salud

Biografía:

Datos personales: Nacido en Cd. Victoria, Tamaulipas el 26 de mayo de 1993, hijo de Gualberto Mora Vázquez y María Guadalupe Castillo Reséndez.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, obteniendo grado de Licenciatura de Químico Clínico Biólogo en 2015 con mención honorífica.